ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ZHUNAN

Μεταγραφική και Επιγενετική Ρύθμιση σε μοντέλα καρκίνου του Μαστού: Ο Ρόλος της πρωτεΐνης της Προμυελοκυτταρικής Λευχαιμίας (PML)

> Transcriptional and Epigenetic Regulation in Breast Cancer Models: The Role of Promyelocytic Leukemia Protein (PML)

> > Αμαλία Βογιατζόγλου Βιολόγος, MSc Διδακτορική Διατριβή

> > > Ηράκλειο Μάρτιος 2021

Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με χρηματοδότηση από το πρόγραμμα «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΙΙ-UMBISTEM) της ΓΓΕΤ και με υποτροφία από την πράξη ΕΔΒΜ103 και τίτλο «Υποστήριξη ερευνητών με έμφαση στους νέους ερευνητές-κύκλος Β'» από πόρους του Ε.Π. «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

Ιωσήφ Παπαματθαιάκης, Ομότιμος Καθηγητής. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Ανδρονίκη Κρετσόβαλη, Ερευνήτρια Β'. Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB)-ITE

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωσήφ Παπαματθαιάκης, Ομότιμος καθηγητής. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Ανδρονίκη Κρετσόβαλη, Ερευνήτρια Β΄. Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB)-ITE Δημήτριος Καρδάσσης, Καθηγητής. Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης Χαράλαμπος Σπηλιανάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωσήφ Παπαματθαιάκης, Ομότιμος καθηγητής. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Ανδρονίκη Κρετσόβαλη, Ερευνήτρια Β'. Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB)-ITE Δημήτριος Καρδάσσης, Καθηγητής. Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης Χαράλαμπος Σπηλιανάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Ελένη Παπαδάκη, Καθηγήτρια. Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης Ηλίας Δράκος, Αναπληρωτής Καθηγητής. Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης Χριστόφορος Νικολάου, Ερευνητής Β'. Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμιγκ" **Στην κόρη μου Ελπινίκη** που ο ερχομός της άλλαξε όλη την κοσμοθεωρία μου, και έχει δείξει υποδειγματική υπομονή για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής… Σε ευχαριστώ!

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πίσω από κάθε Διδακτορική Διατριβή υπάρχει η ιστορία ενός ανθρώπου με όνειρα και στόχους, που με πολλή προσπάθεια, επιμονή, διάβασμα και πάλι διάβασμα, πολλές αποτυχίες, μέχρι να έρθουν οι επιτυχίες, καταφέρνει να ολοκληρώσει τις μεταπτυχιακές σπουδές του. Δεν είναι όμως μόνο το διδακτορικό που αποκτά, η ερευνητική εμπειρία και οι δημοσιεύσεις, για να προχωρήσει στον επόμενο στόχο. Είναι και όλα όσα τον συνόδευαν στο πέρασμα των χρόνων αυτών. Συναισθήματα όπως άγχος, ανησυχία, αμφιβολία, χαρά αλλά και απογοήτευση... που καλείται να μάθει να διαχειρίζεται για να προχωρά και να εξελίσσεται. Είναι οι άνθρωποι που συναναστρέφεται καθημερινά εντός και εκτός εργαστηρίου και που ο καθένας ξεχωριστά του μεταδίδει κάτι. Προσωπικά νιώθω τυχερή που, την τελευταία εξαετία, συνεργάστηκα και δέθηκα με ανθρώπους που θα θυμάμαι πάντα.

Πρώτον από όλους θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή Ιωσήφ Παπαματθαιάκη που με δέχθηκε στο εργαστήριο τους μαζί με την ερευνήτρια Δρ. Ανδρονίκη Κρετσόβαλη και μου έδωσε την ευκαιρία να εξερευνήσω τον κόσμο της Μοριακής Βιολογίας. Ο σεβασμός και ο θαυμασμός μου θα είναι πάντα απεριόριστοι για την ακεραιότητα του χαρακτήρα του, για το πάθος του γύρω από την επιστήμη μας, για την αέναη θέληση του να κάνει πειράματα ο ίδιος, για τη διάθεση του να μαθαίνει και να μας μαθαίνει νέα πράγματα και θα τον ξεχωρίζει πάντα ως Μεγάλο Δάσκαλο. Ακόμα και τις φορές που απογοητευόμουν πλήρως ήταν εκεί να με στηρίξει κ να προχωρήσουμε παρακάτω, πιστεύοντας σε μένα. Οι μεγάλες συζητήσεις μας οι σκέψεις γύρω από νέα πειράματα μου έδιναν ώθηση να μη το βάζω κάτω, να προχωράω, να σκέφτομαι καλύτερα και να ωριμάζω. Συνεχίζοντας, θέλω να ευχαριστήσω την ερευνήτρια Δρ. Ανδρονίκη Κρετσόβαλη που η πίστη της και η στήριξη της σε μένα τα τελευταία τρία χρόνια των σπουδών μου ήταν ζωτικής σημασίας. Πάντα ήταν εκεί να με βοηθάει να βγω από την απελπισία μου, να μας αποτρέπει από πειράματα που δεν είχαν νόημα στις δύσκολες εποχές που ζούμε, να με συμβουλεύει σε σχέση με τη συγγραφή του διδακτορικού και να με ενθαρρύνει να προχωράω με τις σπουδές μου. Είναι η μαμά στο εργαστήριο μας και πάντα είναι εκεί να μας αγκαλιάσει, να μας κρατάει ενωμένους αλλά και να μας πιέσει όταν χρειάζεται. Θέλω να την ευχαριστήσω και για τις φορές που ερχόταν η κόρη μου στο εργαστήριο και μας φρόντιζε και τις δύο.

Να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής μου Καθηγητή Δημήτρη Καρδάσση και Αναπληρωτή Καθηγητή Χαράλαμπο Σπηλιανάκη, για τις συμβουλές τους αναφορικά με την πρόοδο των πειραμάτων μου και την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Όπως επίσης θέλω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής με τους οποίους είχα την τιμή να συνεργαστώ. Την Καθηγήτρια Ελένη Παπαδάκη για τη στήριξη της και τη συνεργασία με την ερευνητική ομάδα της, καθώς και την παρότρυνση της να ολοκληρώσω τη διατριβή μου σε μια δύσκολη περίοδο για μένα. Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ηλία Δράκο για την άψογη συνεργασία μας τον τελευταίο χρόνο των πειραμάτων και τις χρήσιμες συζητήσεις μας γύρω από την ολοκλήρωση τους. Τέλος να ευχαριστήσω θερμά τον ερευνητή Δρ. Χριστόφορο Νικολάου για τη συμβολή του στη διδακτορική μου διατριβή με τη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αυτής της εργασίας. Προχωρώντας θέλω να ευχαριστήσω τον καταπληκτικότερο τεχνικό όλων των εργαστηρίων κ. Τάκη Μακατουνάκη. Αποτελεί πρότυπο για όλους μας, έχει λύσεις για όλα πάντα, καλή διάθεση να βοηθάει όποιον έρχεται για βοήθεια και δεν γίνεται ποτέ, μα ποτέ αγενής. Να τον ευχαριστήσω που με βοηθούσε πάντα με τα τεχνικά κομμάτια των πειραμάτων και των δυσκολιών που έρχονταν μπροστά μας. Θέλω να τον ευχαριστήσω διπλά που ανέχεται ακόμα τη γκρίνια μου και με συμβουλεύει πάντα και επί της ουσίας για πράγματα εντός και εκτός πειραματικών διαδικασιών. Να τον ευχαριστήσω που απασχολούσε την κόρη μου με διάφορα ευφάνταστα κόλπα για να μπορώ να δουλεύω και τον αγαπάει τόσο πολύ. Τέλος να ευχαριστήσω τον τεχνικό μας κ. Γιώργο Βρέντζο για τη βοήθεια με τις κυτταροκαλιέργειες όλα αυτά τα χρόνια, για τις τεράστιες συζητήσεις μας και ας διαφωνούμε τις περισσότερες φορές εκρηκτικά, να τον ευχαριστήσω γα μου και με βρήκε να κλαίω μόνη μου και με έκανε να ξεχαστώ και να χαμογελάσω.

Όλοι οι άνθρωποι που συνεργάστηκα καθημερινά στο πλαίσιο του διδακτορικού έχουν μια ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου. Δημιούργησα αληθινές φιλίες ζωής που, ακόμα και τώρα που μας χωρίζουν μίλια, είμαστε πάντα η μια δίπλα στην άλλη. Η Χριστιάνα, η Κωνσταντίνα, η Νικολέτα, η Χρύσα και η Ναταλία είναι οι δικοί μου άνθρωποι και θα νιώθω πάντα ευγνώμων που τις έχω στη ζωή μου. Η Χριστιάνα, η Κωνσταντίνα και η Νικολέτα με αγκάλιασαν από την πρώτη στιγμή και με βοήθησαν να μάθω πολλές από τις τεχνικές που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Ξεχωριστή θέση έχουν στην καρδιά μου και η Εύα με την Ουρανία, τα δύο μου κορίτσια που τον τελευταίο χρόνο των πειραμάτων μου ήταν εκεί κάθε μέρα να με βοηθάνε να τα ολοκληρώσω, με τις άπειρες ώρες δουλειάς με τα ποντίκια και των συζητήσεων που κάναμε, να μας δένουν για μια ζωή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην Αριστέα, από το εργαστήριο της κ. Παπαδάκη που με τη συνεργασία μας, η οποία εξελίχθηκε σε μια όμορφη φιλία, πάντα με στήριζε και δε με άφηνε να απογοητεύομαι. Να ευχαριστήσω θερμά όλα τα παιδιά που συνεργαστήκαμε στο πλαίσιο των εργασιών τους, τη Μυρσίνη , τον Κωνσταντίνο, την Ίριδα και τον Χάρη αλλά και τα παιδιά που δουλέψαμε μαζί στο εργαστήριο σε διαφορετικά projects, τη Μαρία, τη Γεσθημανή, τη Βούλα, την Ιωάννα, τη Ναυσικά, την Μάρθα, τον Γιώργο και τη Φωτεινή. Σας ευχαριστώ όλους για το όμορφο κλίμα που είχαμε, τις ώρες που παίζατε με την κόρη μου και τις στιγμές που μοιραστήκαμε.

Κλείνοντας να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν με την Ελπινίκη την περίοδο που έπρεπε να δουλεύω παραπάνω, τη Χριστίνα και τον Γιάννη, τη Μαρία, τη Δήμητρα και φυσικά την Κυριακή. Είμαι πολύ τυχερή που τους έχω στη ζωή μου. Θέλω να ευχαριστήσω και την αδερφή μου για τη στήριξη της στις δύσκολες στιγμές μου με τις απεριόριστες τηλεφωνικές συζητήσεις μας και τη φροντίδα της Ελπινίκης όταν χρειάστηκε. Θέλω ολόψυχα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη στήριξη τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου, ηθικά και οικονομικά. Σας ευχαριστώ που με μεγαλώσατε με αρχές και αξίες και με μάθατε να βάζω στόχους. Σας ευχαριστώ που μου δώσατε τη δυνατότητα να κυνηγήσω τα όνειρα μου και να γίνω ο άνθρωπος που είμαι σήμερα. Τέλος να ευχαριστήσω τον σύζυγο μου, το στήριγμα μου, που παρά τις δυσκολίες που περάσαμε, δε σταμάτησε ποτέ να πιστεύει ότι θα τα καταφέρω και με στηρίζει έμπρακτα στην επίτευξη των στόχων μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
Μαστός και Ανάπτυξη(Mammary Gland development)	14
Βλαστικά Κύτταρα Μαστού (mammary stem cells-MaSCs)	15
Καρκίνος του Μαστού (Breast Cancer)	17
Αιτιολογία	19
Σωματικές μεταλλάξεις	19
Καρκινικά Βλαστικά κύτταρα μαστού (BCSCs)	20
Ετερογένεια του καρκίνου	23
Μικροπεριβάλλον	26
ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	26
EMT	26
Οργανοτροπισμός	31
Πρωτεΐνη της Προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Promyelocytic Leukemia protein-	_
PML)	35
Ρύθμιση της πρωτεΐνης PML	37
Μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση του PML γονιδίου	37
Μετα-μεταφραστική ρύθμιση του PML	38
ΡΜL πυρηνικά σωμάτια (PML-NBs)	40
PML στη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων	42
Ο Ρόλος της PML στον καρκίνο	43
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
Πλασμίδια	47
Διαμολύνσεις και παραγωγή λεντιϊών	47
Κυτταρικές σειρές και δημιουργία σταθερών κλώνων	48
Εκχύλιση RNA και ποσοτική αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qR	₹T-
PCR)	48
RNA αλληλούχιση	48
Ανάλυση των λιστών με τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια	48
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western-Blot Analysis-WB)	49
Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation-IP)	49
FACs analysis	50
Ανοσοχρώσεις και μικροσκοπία	50
Ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης	50

Δοκιμασία μετανάστευσης και διείσδυσης κυττάρων	50
Statistical analysis	51
In vivo πειράματα σε πειραματόζωα	51
Έγκριση διενέργειας πειραμάτων σε ζώα	51
Η αποσιώπηση της PML πρωτεΐνης επηρεάζει τη κυτταρική μορφολογία και την ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται	53
Η αποσιώπηση της PML επηρεάζει τα μεταγραφικά πρότυπα των MDAMB231 & MFC7 κύτταρων	55
Η PML πρωτεΐνη συμβάλλει στη διατήρηση των επιθηλιακών χαρακτηριστικών τω κυττάρων, ιδιαίτερα στα MDA.MB.231.	ν 59
Η PML πρωτεΐνη επιδρά διαφορετικά στην ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζο σφαίρες <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> .	ουν 62
Η PML πιθανά συμμετέχει στη ρύθμιση της καρκινικής αγγειογένεσης στις υποξικα συνθήκες του πρωτογενούς όγκου, εν μέρει αλληλεπιδρώντας με την HIF1a	ές 65
Η αποσιώπηση της PML πρωτεΐνης συμβάλλει στην ενίσχυση της μεταστατικότητα των MDA.MB.231 κυττάρων <i>in vivo</i>	ας 67
Η απώλεια της PML συμβάλλει στην ανάπτυξη κυρίως πνευμονικών μεταστάσεων στα MDA.MB.231	, 72
Η PML πιθανά ρυθμίζει την επιθηλιακότητα των MDA.MB.231 εμποδίζοντας τη δράση των ΕΜΤ παραγόντων	77
Η PML αλληλεπιδρά κατ'εξοχήν με τις μεταλλαγμένες μορφές της p53	81
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	86
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ	92
Εισαγωγή	95
Στελεχιαία/Στρωματικά Μεσεγχυματικά Κύτταρα (Mesenchymal Stromal/ Stem Ce – MSCs)	ells 95
Σκοπός	97
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	98
Κύτταρα μελέτης	98
Διαφοροποίηση των WJ-MSCs σε οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα	98
Εκχύλιση RNA και ποσοτική αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qR] PCR)	Г- 98
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western-Blot Analysis-WB)	99
Ανοσοχρώσεις και μικροσκοπία	. 100
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	101
Τα WJ-MSCs εκφράζουν την PML και τους παράγοντες πλειοδυναμίας	101
Η PML αυξάνεται στην πορεία της διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς οστεοκύττ και μειώνεται όταν αυτά διαφοροποιούνται προς λιποκύτταρα	ταρα . 103
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	. 105
ПАРАРТНМА	. 106
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	. 113

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ετερογενής ασθένεια που αποτελεί τον πιο συχνά εμφανιζόμενο καρκίνο στις γυναίκες ετησίως. Η Ετερογένεια αφορά την προέλευση των κυττάρων, τον συνδυασμό των «οδηγών» μεταλλάξεων, την κλωνική και επιγενετική επιλογή, που αντικατοπτρίζονται στην φαινοτυπική ποικιλομορφία, την απόκριση στη θεραπεία και την κλινική έκβαση του ασθενή. Αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τη συχνότητα και τη θέση των μεταστάσεων και την αντίσταση στη θεραπεία. Η ετερογένεια, που προκύπτει από γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, μπορεί επίσης να αναπτυχθεί με την πάροδο του χρόνου εντός του ίδιου υποτύπου ή ακόμη και του ίδιου όγκου, καθιστώντας έτσι τις στοχευμένες εξατομικευμένες προσεγγίσεις υψηλή προτεραιότητα για την επίτευξη αποτελεσματικών θεραπειών. Για αυτό τον σκοπό, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη βιολογική και κλινική συμπεριφορά του όγκου είναι υψίστης σημασίας. Η πρωτεΐνη της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (PML) είναι ο βασικός οργανωτής πυρηνικών δομών που διευκολύνουν διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις βασικών ρυθμιστικών παραγόντων που μεσολαβούν σε πολλαπλά επίπεδα στην επιβίωση των κυττάρων. Η PML ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε σύντηξη με τον υποδοχέα RARa, την πρωτεΐνη PML-RARa, που προκαλεί την οξεία μυελοκυτταρική λευχαιμία. Επόμενες μελέτες απέδωσαν στην PML ογκοκατασταλτικές ιδιότητες που προκαλούνται από προ-αποπτωτικά, προ-γηραντικά και ανασταλτικά σήματα του κυτταρικού κύκλου, σε συνδυασμό με την έλλειψη έκφρασης της σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες, αποκάλυψαν ότι, με τρόπο που εξαρτάται από το περιβάλλον, το PML μπορεί επίσης να εμφανίζει προ-ογκογονικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, στη χρόνια μυελοειδή λευχαιμία (CML), σε γλοιοβλαστώματα (GBM) και σε ορισμένες περιπτώσεις τριπλού αρνητικού καρκίνου του μαστού (TNBC), το PML εκφράζεται έντονα, βοηθώντας στη διατήρηση του καρκινικού πληθυσμού, είτε ρυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο, είτε συμβάλλοντας στη ρύθμιση της αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου. Κατά συνέπεια, το PML έχει διπλό ρόλο στην ογκογένεση που ενεργεί ως κατασταλτικός παράγοντας ή ως προογκογόνος σε συγκεκριμένα κυτταρικά υπόβαθρα. Ο σκοπός αυτής της διατριβής ήταν να αποσαφηνίσει τους μοριακούς στόχους, μέσω των οποίων, η PML ρυθμίζει τη βλαστικότητα και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του μαστού ως ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση του ρόλου των μοριακών στόχων που καθορίζουν την προ-ή αντιογκογονική δράση του. Στο πλαίσιο αυτό έγινε αποσιώπηση του PML γονιδίου σε χαρακτηρισμένα ανθρώπινα καρκινικά κυτταρικά μοντέλα του μαστού. Τα πειραματικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποσιώπηση της PML ενισχύει την κινητικότητα των κυττάρων και τα μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά τους σε κυτταρικές καλλιέργειες, καθώς επίσης αύξησε την επιθετική συμπεριφορά των MDA-MB-231 κυττάρων, δημιουργώντας μεγαλύτερους όγκους και περισσότερες μεταστάσεις, αλλά όχι στα επιθηλιακά ER θετικά MCF7 κύτταρα. Τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης δείχνουν έμμεσα την υψηλότερη αγγείωση των όγκων PML-KD μια επίδραση που μπορεί να προκαλείται από ενισχυμένη απόκριση στην υποξία. Πιο σημαντικά, οι κυτταρικές σειρές που προέρχονται από πρωτογενείς όγκους in vivo ή μεταστάσεις του πνεύμονα, είναι περισσότερο επιθετικές και έχουν ενισχυμένες προαγγειογόνες ιδιότητες που μπορεί να προκύψουν από επιγενετική ή εκτεταμένη κλωνική επιλογή in vivo απουσία PML. Η PML αλληλεπιδρά με παράγοντες στόχους της p53 πρωτεΐνης, όπως παράγοντες της επιθηλιομεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) και ο βασικός ρυθμιστής της υποξίας HIF1a, ρυθμίζοντας τη δράση τους σύμφωνα με το γενετικό υπόβαθρο των κυττάρων.

Είναι ενδιαφέρον ότι βρήκαμε διάφορους bHLH παράγοντες που περιλαμβάνουν τον HIF1a και τους EMT, όπως το Twist και το Snail, να αλληλεπιδρούν με την PML και πιθανότατα παρεμποδίζονται να προκαλέσουν EMT. Έτσι, η PML εμποδίζει την επιθετική EMT-μεταστατική συμπεριφορά των MDA-MB-231 αλλά όχι των κυττάρων MCF7 που δεν εκφράζουν EMT παράγοντες ή ιδιότητες. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, το μεταγραφικό προφίλ αυτών των κυττάρων αποκαλύπτει ότι σημαντικές βιολογικές λειτουργίες όπως η κυτταρική προσκόλληση, ο κυτταρικός κύκλος και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κυτταρική μετάσταση απορρυθμίζονται από την αποσιώπηση της PML στα MDA-MB-231 αλλά όχι στα MCF7 κύτταρα.

Ένας κοινός σύνδεσμος στα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Η φυσιολογική p53 ενεργοποιείται και δεσμεύεται από την PML σε συνθήκες κυτταρικού στρες για να ενεργοποιήσει την κυτταρική γήρανση και την αποπτωτική λειτουργία. Εμείς δείχνουμε ότι το PML δεσμεύει πολύ ισχυρότερα τις μεταλλαγμένες μορφές του p53, όπως είναι και στα MDA-MB-231 (R280K) σε σχέση με τη φυσιολογική p53 που υπάρχει στα MCF7 κύτταρα. Δεδομένου ότι η μεταλλαγμένη p53 είναι έχει ισχυρά ογκογόνο δράση, υποθέτουμε ότι το PML είναι ένα λειτουργικό εμπόδιο στην ογκογόνο δράση της μεταλλαγμένης p53, όπως υποδεικνύεται από δεδομένα επιβίωσης της TCGA βάσης δεδομένων που συσχετίζουν την υψηλή έκφραση της PML με καλύτερη

9

πρόγνωση σε ασθενείς με μεταλλαγμένη p53 σε περιπτώσεις TNBC καρκίνου του μαστού, αλλά όχι στις περιπτώσεις που η p53 ήταν φυσιολογική. Η αποσιώπηση της PML μπορεί έτσι να απελευθερώνει τη δραστικότητα της μεταλλαγμένης p53 για να προάγει τη μετάσταση μέσω EMT, αγγειογένεσης ή έκκρισης εξωσωμικών κυτταρικών κυστιδίων. Τα πειράματα για την άμεση αποσαφήνιση του ρόλου του PML στο μεταλλαγμένο p53 στις παραπάνω διαδικασίες βρίσκονται σε εξέλιξη.

ABSTRACT

Breast cancer, the most common cancer in women, is a heterogeneous disease. Heterogeneity sources are the cell of origin, driver mutations combination, clonal and epigenetic evolution, which is reflected in the diversity of its phenotypes, therapy response and clinical outcomes. Those factors affect cell proliferation rates, the frequency and site of metastases and therapy resistance. The heterogeneity, which results from genetic and epigenetic changes, may also develop over time within the same subtype or even the same tumor itself, thus making targeted-personalized approaches a high priority to achieve effective theparies. To this end understanding the molecular mechanisms that govern the tumor biological and clinical behavior is of outmost importance. Promyelocytic leukemia protein (PML) is the core organizer of nuclear structures that facilitate diverse proteinprotein inteactions and posttranslational modifications of key regulatory factors that mediate multiple effects in cell survival. PML has first recognized as a fusion with the RARa receptor that causes Acute Myelocytic Leukemia. Following studies assign to PML a tumor suppressor properties mediated by pro-apoptotic, pro-aging and cell cycle inhibitory signals in line with lack of expression in samples of primary tumors, including breast cancer. However, more recent studies, revealed that in a context dependent way, PML may also show pro-oncogenic properties. Specifically, in chronic myeloid leukemia (CML), in glioblastomas (GBM) and in some cases of triple-negative breast cancer (TNBC), PML is higly expressed, helping to maintain the cancer population, either by regulating their cell cycle, or by contributing to the regulation of cancer stem cells self-renewal. Consequently, PML has a dual role in tumourigenesis acting as a tumour suppressor or promoter in cell specific contexts. The aim of this dissertation was to clarify the molecular targets through which PML regulates the stemness and metastasis of breast cancer cells as a first step that towards understanding the role of molecular players that determine its pro- or anti-oncogenic action, using a PML knock down in well characterized human cancer cell models. Our experimental results suggest that PML loss enhances cell mobility and the mesenchymal features in cell culture and the aggressive behavior of MDA-MB--231 cell type manifested high graft-site tumor growth, lymph node and lung metastasis rate but not the epithelial ER positive MCF7 cells. Histology results indirectly point to higher vascularization of PML -KD tumors an affect that may be mediated by a higher hypoxic response. More importantly, cell lines derived from in vivo primary tumors or lung metastasis have further enhanced aggressive and

proangiogenic properties that may result from epigenetic or extensive clonal selection in vivo in the absence of PML. PML interacts with p53 target factors, such as EMT factors and HIF1a, regulating their action according to the genetic background of the cells.

Interestingly, we found that various the bHLH type factors that include the HIF1a master hypoxia regulator and EMT mediators such as Twist and Snail interact with PML and are likely inhibited from exerting their EMT via DNA binding. Thus PML impedes the aggresive EMT-metastatic behavior of MDA- MB-231 but not MCF7 cells that do not express EMT factors or properties. In agreement with the above, transcriptional profiling of these cells reveals that important biological functions such as cell adhesion, cell cycle, and signaling pathways associated with cell metastasis are deregulated by PML knock down in MDA–MB-231 but not MCF7 cells.

A common link in the above results may the p53 tumor suppressor protein. Wild type p53 is activated and bound by PML under stress to mediate pro-senescence and apoptotic functions. We show here that PML binds much stronger to mutant forms of p53 as found in the MDA-MB-231 (R280K) relative to wild type p53 carried by MCF7 cells. Since mutant p53 is a strong gain of fuction oncogenic driver, we assume that PML is a functional barrier to the tumor–promoting action of mutant p53 as indicated by TCGA survival data that correlate high PML expession with better prognosis in mutant p53 but not wild type p53 TNBC patients. PML loss may thus release activity of mutant p53 to promote metastasis via EMT, angiogenesis or secretion of exosomal vesicles. Experiments to directly address the role of the PML in mutant p53 in the above processes are under way.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μαστός και Ανάπτυξη(Mammary Gland development)

Ο Μαστός αποτελεί έναν περίπλοκο επιθηλιακό εκκριτικό αδένα, ο οποίος απαρτίζεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους, οι οποίοι διαμορφώνονται από δύο βασικούς, τα βασικά (basal) κύτταρα και τα κύτταρα του αυλού (luminal). Το βασικό επιθήλιο αποτελούμενο από μυοεπιθηλιακά κύτταρα, σχηματίζει την εξωτερική στοιβάδα του αδένα, καθώς επίσης παράγει και τα βλαστικά κύτταρα τα οποία δίνουν γένεση σε άλλους κυτταρικούς τύπους του μαστού. Το επιθήλιο του αυλού (lumen) σχηματίζει τους αγωγούς (ducts) και τις εκκριτικές κυψελίδες (alveoli). Η μυοεπιθηλιακή στιβάδα και τα κύτταρα του αυλού σχηματίζουν τους γαλακτοφόρους αδένες (secretory alveoli) που συσπώνται κατά την περίοδο της γαλουχίας, ώστε να εκκριθεί το γάλα από τις κυψελίδες και μέσω των αγωγών στις θηλές του μαστού.



Εικόνα 1 η δομή του μαστού στον άνθρωπο και στο ποντίκι (Α) εγκάρσια (Β) και διαμήκης απεικόνιση (C) του αγωγού του μαστού (Fu et al., 2020) TDLU: Terminal duct lobular unit.

Ο μαστός έχει τρία βασικά στάδια ανάπτυξης, το εμβρυϊκό, το εφηβικό και το αναπαραγωγικό. Κατά τη γέννηση, ο μαστικός αδένας έχει στοιχειώδη διακλάδωση, περιβαλλόμενη από λιποκύτταρα· όμως στην εφηβεία επάγεται αύξηση της διακλάδωσης μέσω της δράσης αυξητικών παραγόντων και οιστρογόνων μέσα στον λιπώδη ιστό, δημιουργώντας περισσότερους αγωγούς και κυψελίδες (terminal ductal lobulo-alveolar units-TDLUs) (εικόνα 1). Η δομή αυτή περιβάλλεται από λιποκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Την αναπαραγωγική περίοδο, και συγκεκριμένα την περίοδο της εγκυμοσύνης, οι κυψελίδες και οι αγωγοί αυξάνονται σε αριθμό και μέγεθος λόγω έκκρισης της ορμόνης προγεστερόνης, καταλαμβάνουν τον περιβάλλοντα λιπώδη ιστό και μετατρέπονται σε εκκριτικούς γαλακτοφόρους αδένες για την περίοδο της γαλουχίας.



Εικόνα 2 Στάδια ανάπτυξης μαστού από τη γέννηση έως και την περίοδο του αποθηλασμού στο ποντίκι (Macias & Hinck, 2012)

Μετά το τέλος της γαλουχίας και τον αποθηλασμό, ο μαστικός αδένας επανέρχεται στην προηγούμενη, λιγότερο διακλαδιζόμενη, δομή καθώς οι κυψελίδες καταστρέφονται μετά από απόπτωση σε δύο διαδοχικά στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά το εναπομείναν γάλα στους πόρους και τους αγωγούς, το οποίο επάγει την απόπτωση των κύτταρων, ενώ το δεύτερο στάδιο προκαλείται από τη μείωση της ορμόνης προλακτίνης και την διαφοροποίηση της εξωκυττάριας ύλης (ECM) όπου ολοκληρώνεται η επαναφορά στην προηγούμενη δομή κατά την αναπαραγωγική περίοδο. (εικόνα 2) (Macias and Hinck 2012)

Βλαστικά Κύτταρα Μαστού (mammary stem cells-MaSCs)

Η πολυπλοκότητα του μαστού στην ικανότητα να διευρύνεται και να παλινδρομεί στην πρότερη διακλαδιζόμενη δομή του έγκειται στην ύπαρξη βλαστικών κυττάρων στον μαστό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ατόμου. Βλαστικό κύτταρο είναι αυτό που διατηρεί την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται, αυτο-ανανεώνοντας τον πληθυσμό του ενώ ταυτόχρονα είναι ικανό να διαφοροποιείται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Έτσι και στην περίπτωση του μαστού, το 1959 ο Deome και οι συνεργάτες του, επιβεβαίωσαν την ύπαρξη βλαστικών κυττάρων, όταν μεταμόσχευσαν τμήματα μαστικού ιστού σε άδεια κοιλότητα μαστού νεαρών ποντικών με αποτέλεσμα να αναπτυχθούν πλήρως δομημένοι και διαμορφωμένοι αγωγοί του μαστού (DEOME et al. 1959) Από τότε και μέχρι σήμερα γίνονται προσπάθειες για να χαρακτηριστούν όσο το δυνατόν καλύτερα οι υποπληθυσμοί των βλαστικών κυττάρων που φέρει ο μαστικός αδένας, χρησιμοποιώντας τεχνολογίες όπως η μεταμόσχευση και η καλλιέργεια ιστού, η απομόνωση κυτταρικών πληθυσμών με βάση την έκφραση κυτταροειδικών πρωτεϊνών με κυτταρομετρία ροής (FACs-sorting)ή αλληλούχιση RNA από μοναδιαία κύτταρα (single cell RNA-sequencing).

Με την απομόνωση των μαστικών βλαστικών κυττάρων (MaSCs) με βάση το γονιδιακό τους υπόβαθρο, κατέστη δυνατή μια βασική ιεράρχηση των πολλαπλών κυτταρικών πληθυσμών που προκύπτουν από αυτά, όπως είναι οι γαλακτοφόρες κυψελίδες, αλλά και κυττάρων που παραμένουν βλαστικά καθόλη τη διάρκεια ζωής, διατηρώντας την ικανότητα αυτο-ανανέωσής τους (εικόνα 3). Η πλειονότητα των κυττάρων που είχαν πολυδύναμο χαρακτήρα (multipotent) εντοπίζονται στο βασικό στρώμα των αγωγών και μάλιστα μόνο το 2-5% αποτελούν βλαστικά κύτταρα, ενώ η πλειοψηφία των βασικών κυττάρων αποτελείται από προγονικά και τελικώς διαφοροποιημένα μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Από την άλλη μεριά κύτταρα από τον επιθηλιακό αυλό δεν παρουσιάζουν την ίδια πολυδυναμία. Παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε και με τις πρόσφατες καινοτόμες τεχνικές των οργανοειδών, δείχνει ότι κύτταρα του αυλού του επιθηλίου ποντικού ανέπτυξαν αποκλειστικά επιθήλια του αυλού (luminal-restricted organoids), σε αντίθεση με κύτταρα του βασικού στρώματος που ανέπτυξαν περίπλοκες δομές επιθηλίων του αυλού, περιβαλλόμενες από μυοεπιθηλιακά κύτταρα, που προσομοίαζαν τη δομή του μαστού. Αντίστοιχα στον ανθρώπινο μαστό υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες MaSCs, τα βασικά-μυοεπιθηλιακά (basalmyoepithelial), τα προγονικά κύτταρα του αυλού (luminal progenitor) και τα ώριμα κύτταρα του αυλού (mature luminal cells) με βάση την έκφραση επιφανειακών δεικτών (Πίνακας 1).

Markers used	References	
CD45, CD10,	Stem-like: Lin ⁻ CD10 ⁻ CD24 ⁻ CD44 ⁺ or Lin ⁻ CD10 ⁻ CD24 ⁻	Shipitsin et al., 2007
CD14, CD15,	PROCR ⁺ CD44 ⁺	
CD19, CD24,		
CD44		
CD31, CD45,	Luminal progenitor: Lin ⁻ CD49f ⁺ EpCAM ⁿ	Villadsen et al., 2007
CD34, IB10,	Myoepithelial (multipotent): Lin ⁻ CD49f [*] EpCAM ^{hi}	
CD49f, EpCAM		
CD45, CD31,	MaSC: Lin ⁻ CD49f ⁺ EpCAM ^{-Now}	Eirew et al., 2008
CD235, CD49f,	Luminal progenitor: Lin ⁻ CD49f ⁺ EpCAM ⁺	Lim et al., 2009
EpCAM	Mature luminal: Lin ⁻ CD49f ⁻ EpCAM ⁺	Shehata et al., 2009
CD24, CD49f,	MaSC: CD24"CD49f"DNER"	Pece et al., 2010
DNER		
CD45, CD31,	MaSC/common progenitor: CD10 ⁺ EpCAM ⁻	Bachelard-Cascales
CD34, CD45, IB10, Mature luminal: CD10⁻EpCAM ⁺ et al., 2010		
EpCAM, CD10		Keller et., al 2012

Πίνακας 1 Επιφανειακοί δείκτες επιθηλιακών κυτταρικών υποπληθυσμών από ιστό ανθρώπινου μαστού(Fu et al. 2020)

Μέσα στους πληθυσμούς των MaSCs φαίνεται ότι υπάρχουν κύτταρα που είναι σε κυτταρικό ύπνο (quiescence), ώστε να διατηρούν την αναγεννητική τους ικανότητα. Τα ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα του μαστού που βρίσκονται σε κυτταρικό ύπνο, εντοπίζονται στους αγωγούς των TDLUs, ενώ τα προγονικά κύτταρα (progenitor cells) εντοπίζονται στους λοβούς. (εικόνα 3) (Fu et al. 2020)



Εικόνα 3 Ταξινόμηση βλαστικών και προγονικών κυττάρων του ανθρώπινου μαστού (Lloyd-Lewis et al. 2017)

Καρκίνος του Μαστού (Breast Cancer)

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ετερογενής ασθένεια που αποτελεί το 30% των διαγνώσεων καρκίνου στις γυναίκες ετησίως ενώ το 40% αυτών, παρόλη την επιτυχή αντιμετώπιση, έχει επανεμφάνιση στην επόμενη 5ετία. Η κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού στο παρελθόν γινόταν με βάση την ιστολογική ανάλυση των δειγμάτων αναφορικά με την έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα (ER⁺), του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR⁺) ή του ανθρώπινου επιδερμικού παράγοντα (HER2⁺) (Prat and Perou 2011). Πλέον η ταξινόμηση γίνεται και βάσει του γονιδιακού προφίλ των απομονωθέντων κυττάρων από τους όγκους που βασίζεται σε 50 συγκεκριμένα γονίδια χαρακτηριστικά για κάθε υπότυπο που έχει προκύψει από αναλύσεις μικροσυστοιχιών (microarray) (PAM50). Μέσα στα γονίδια αυτά ανήκουν οι υποδοχείς για ορμόνες, για τα οιστρογόνα (ER), για την προγεστερόνη (PRG), για τον ανθρώπινο επιδερμικό αυξητικό παράγοντα 2 (HER2), τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGFR), ο παράγοντας Ki67 (χαρακτηριστικός για τον πολλασιασμό) και τις κυτοκερατίνες 5/6 (CK5/6). Έχουν ταυτοποιηθεί έξι υπότυποι καρκίνου του μαστού και κατατάσσονται από τους πιο επιθετικούς έως τους λιγότερο επιθετικούς ως claudin-low, basal-like, HER2⁺, Luminal B, Luminal A και Normal Breast-like αντίστοιχα (εικόνα 4). Οι τριπλά αρνητικοί τύποι καρκίνου (υπότυποι claudin-low και basallike) έχουν υψηλή συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών των γονιδίων p53 και BRCA1/2 (πίνακας 2) (Chen et al. 2018). Σύμφωνα με μεταγραφικές (trascriptomic) μελέτες πάνω σε 465 πρωτογενείς όγκους TNBC (triple negative breast cancer), μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις περαιτέρω υπότυπους, συγκεκριμένα τους luminal androgen receptor, τους immunomodulatory, τους basal-like immune-suppressed και τους mesenchymal-like (Jiang et al. 2019).



Εικόνα 4 Απεικόνιση της ταξινόμησης των υποτύπων του καρκίνου του μαστού με βάση την έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα (ER⁺),του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR⁺), του ανθρώπινου επιδερμικού υποδοχέα (HER2⁺) ή όχι (Triple negative ER⁻PR⁻HER2⁻) και συνδυαστικά με το γονιδιακό τους προφίλ προέλευσης (Saeg and Anbalagan 2018)

	Πίνακας 2 Breast cancer molecular subtypes and median duration of survival with distant metastasis
((Chen et al. 2018)

Molecular subtypes	Biological markers	Median durations of survival from time of first distant metastasis
Luminal A	ER-positive and/or PgR-positive, HER2-negative and Ki67low	2.2 years
Luminal B	ER-positive and/or PgR-positive, HER2-negative and Ki67high	1.6 years
Luminal-HER2	ER-positive and/or PgR-positive and HER2-positive	1.3 years
HER2-enriched	ER-negative, PgR-negative, HER2-positive	0.7 years
Basal-like	ER-negative, PgR-negative, HER2-negative, and EGFR-positive or CK5/6-positive	0.5 years
Triple-negative phenotype (TN)	ER-negative, PgR-negative, HER2-negative, high frequency of p53 mutations. 80% of them express basal-like phenotype, and negative for both EGFR and CK5/6 are called TN-nonbasal	0.9 years

Αιτιολογία

Σωματικές μεταλλάξεις

Οι σημειακές σωματικές μεταλλάξεις προκύπτουν από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA ή από βλάβη που προκαλείται στο DNA και δεν επιδιορθώνεται ή επιδιορθώνεται λανθασμένα. Βλάβη στο DNA μπορεί να προκληθεί από εξωγενή ερεθίσματα, όπως είναι τα χημικά ή η ιοντίζουσα ακτινοβολία (UV), και από ενδογενή ερεθίσματα όπως η συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Οι σωματικές μεταλλάξεις αφορούν σημειακές νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις, και χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως μετατοπίσεις ολόκληρων γονιδιακών περιοχών, αντικαταστάσεις και απαλοιφές. Ανάλογα το επίπεδο κυτταρικής ρύθμισης που επηρεάζει μια μετάλλαξη (πολλαπλασιασμός, απόπτωση, διαφοροποίηση), μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά ποσοστά και άλλων σημειακών μεταλλάξεων μέχρι και απώλεια της χρωμοσωμικής σταθερότητας. Οι σωματικές μεταλλάξεις συσσωρεύονται φυσιολογικά στα κύτταρα χωρίς να επηρεάζουν τη φυσιολογία τους. Ένα μικρό ποσοστό αυτών αποτελούν «driver mutations» και σχετίζονται με ανάπτυξη καρκίνου, δίνοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα να παρακάμπτουν τους φυσιολογικούς κυτταρικούς μηχανισμούς που οδηγούν το κύτταρο σε θάνατο. Μελέτες σε κληρονομήσιμους καρκίνους οδήγησαν στην ταυτοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων που είχαν αποσιωπηθεί, εξαιτίας μεταλλάξεων σε σωματικά ή γαμετικά κύτταρα και είχαν περάσει στις επόμενες γενεές μέσω της φυσικής επιλογής. Τα τελευταία χρόνια και με την εξέλιξη της τεχνολογίας, έχουν αναπτυχθεί high-throughput τεχνικές αλληλούχισης του γονιδιώματος. Κατά συνέπεια έχουν αναπτυχθεί πλατφόρμες όπως η TCGA (The Cancer Genome Atlas), όπου έχουν χαρακτηριστεί μεταγραφικά πάνω από 20000 πρωτογενείς καρκίνοι συγκριτικά με φυσιολογικά δείγματα και έχουν κατηγοριοποιηθεί σε 33 καρκινικούς τύπους. Σύμφωνα με αναλύσεις με βάση την TCGA, την COSMIC (https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic, βάση δεδομένων για σημειακές σωματικές μεταλλάξεις) και την Cancer Gene Census (CGC, βάση δεδομένων για σημειακές μεταλλάξεις γαμετοκυττάρων και των επιπτώσεων τους), ανάμεσα στα 198 χαρακτηρισμένα ογκογονίδια που σχετίζονται με 20 διαφορετικούς τύπους κακοηθειών και τα 145 επικαιροποιημένα γονίδια, μόνο τρία είναι μεταλλαγμένα σε περισσότερο από το 10% των ασθενών αυτά είναι τα TP53 (36.1%), PIK3CA (14.3%) και το BRAF (10%). Στηριζόμενοι σε αυτές τις βάσεις δεδομένων και τις μελέτες που περιλαμβάνουν, είναι δυνατή η ομαδοποίηση των γονιδιακών μεταλλάξεων και η συσχέτιση με το προκαρκινικό στάδιο, τις μετέπειτα πιθανές μεταλλαγές, τον πιθανό καρκινικό τύπο που θα εμφανίσει το άτομο, το

19

όργανο εμφάνισης και την πρόγνωση που θα έχει (Martincorena and Campbell 2015), (Sondka et al. 2018).

Καρκινικά Βλαστικά κύτταρα μαστού (BCSCs)

Καρκινικά κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν και από ενήλικα βλαστικά κύτταρα (Adult Stem Cells) που υπάρχουν στους ιστούς καθόλη τη διάρκεια ζωής του ατόμου με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και την επιδιόρθωσή τους. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται και αυτά από την ικανότητά τους για αυτο-ανανέωση και την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς ιστούς ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Αρχικά τακτοποιήθηκαν στον αιμοποιητικό ιστό όταν κλωνοποιήθηκαν σε ποντίκια και παρατηρήθηκε ότι διατηρούσαν την ικανότητα αυτοανανέωσής τους *in vivo*.

Στην περίπτωση του καρκίνου, όπου ο κυτταρικός πληθυσμός είναι ετερογενής, υπάρχει μια ομάδα κυττάρων που διατηρούν την ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται συμβάλλοντας στην διατήρηση του καρκινικού πληθυσμού και την αύξηση του όγκου. Αυτή η ομάδα κυττάρων αποτελεί τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Beck and Blanpain 2013).





Και στην περίπτωση του μαστού, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα μικρό μέρος του ετερογενούς πληθυσμού ενός συμπαγούς όγκου, το οποία πολλαπλασιάζονται συνεχώς και συμβάλλουν στην αύξηση του μεγέθους του όγκου. Ο Al-Hajj και οι συνεργάτες του το 2003 ήταν οι πρώτοι που ταυτοποίησαν κύτταρα που ήταν ικανά να σχηματίσουν

όγκους (tumor-initiang CSCs) στον καρκίνο του μαστού, χρησιμοποιώντας τους επιφανειακούς δείκτες CD44 and CD24. Αυτός ο μικρός υποπληθυσμός μέσα στα πρωτογενή καρκινικά κύτταρα με CD44⁺/CD24⁻/lin⁻ φαινότυπο ήταν ικανός να παράξει όγκους σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια με την ίδια ετερογένεια με τον αρχικό πληθυσμό, ενώ για άλλα κύτταρα από τον αρχικό πληθυσμό αυτό δεν ήταν εφικτό (Al-Hajj et al. 2003). Από τότε, μια σειρά μελετών οδήγησε στην ταυτοποίηση και άλλων BCSCs πληθυσμών, όχι μόνο από ασθενείς, αλλά και από χαρακτηρισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού με διαφορετικούς φαινοτύπους (Πίνακας 4) (εικόνα 5).

Μοριακά χαρακτηρίζονται από την έκφραση πληθώρας δεικτών όπως οι γλυκοπρωτεΐνες CD44, CD24 και CD133, ο επιθηλιακός δείκτης κυτταρικής προσκόλλησης (EpCAM), η νεστίνη (nestin), η δισιαλογαγγλιοσίδη GD2, η ιντεγκρίνη CD49f (ITGA6), ο υποδοχέας CXCR4, η χημειοκίνη CXCL1, τα ένζυμα HMGCS και ALDH1, οι γλυκοπρωτεΐνες CD61, CD166 και CD47, καθώς και ο μεταφορέας ABCG2. Ο δείκτης CD44 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη στην οποία προσδένονται πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ύλης (Extracellular matrix-ECM) και κυρίως το υαλουρονικό οξύ το οποίο συμβάλλει στη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, της μετανάστευσης των κυττάρων και της διεισδυτικότητάς τους στους ιστούς. Η υψηλή έκφραση του CD44 συνδέεται με χαμηλή πρόγνωση για τον ασθενή, αφού εντοπίζεται σε καρκινικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν νέους όγκους (tumor-initiating cells) σε διάφορους τύπους καρκίνου και έτσι εντάσσεται στους CD24, μιας άλλης εξωκυττάριας γλυκοπρωτεΐνης, έχει δειχθεί ότι προάγει την αύξηση του όγκου και την επαγωγή της μετάστασης (Saeg and Anbalagan 2018).

Η έκφραση του CD44/CD24 φαινοτύπου αποτελεί χαρακτηριστικό-κλειδί για τη απομόνωση των BCSCs και μάλιστα διαφοροποιείται ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του μαστού, με τις πιο επιθετικές μεταστατικές μορφές (όπως οι claudin-low TNBC) να εκφράζουν CD44⁺/CD24⁻. Εν τούτοις, έχουν χαρακτηριστεί και άλλοι δείκτες για τα BCSCs (πίνακας 3, 4). Κλινικά, τα BCSCs θεωρούνται υπεύθυνα για τη μειωμένη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία των ασθενών και την επανεμφάνιση της νόσου, λόγω της ανθεκτικότητας που θεωρητικά εμφανίζουν στην ακτινοβολία, τις κυτταροτοξικές χημειοθεραπείες και τις μοριακά στοχευμένες θεραπείες (Zhou et al. 2019) (X. Zhang, Powell, and Li 2020).

Πίνακας **3 Σχετική έκφραση BCSCs δεικτών σε υπότυπους καρκίνου του μαστού και χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές** (X. Zhang, Powell, and Li 2020)

			Breast Cancers Primary tumors		Breast Cancer Cell lines		l lines	
			TNBC	C HER2+	luminal	Basal	Basal	luminal
						/mesenchymal	/epithelial	
		Basal-	Claudi	n				
	like		-low					
CD44 ⁺ /CD24 ⁺							+	
CD44 ⁺ /CD24 ^{low/-}		+	++			+		
CD44 ^{low/-} CD24 ⁺								+
ALDH1 ⁺		++	+	+				

Πίνακας 4 Χαρακτηριστικοί δείκτες BCSCs που έχουν ταυτοποιηθεί στον καρκίνο του μαστού σε διαφορετικά συστήματα(Zhou et al. 2019) BCSC markers Study (year) Annotations of markers Mouse model or cell line

			used for the BCSC enrichment
MOST COMMONLY U	JSED MARKERS		
CD44*/CD24 ^{-/lo}	Al-Hajj et al. 2003 Shipitsin et al 2007	<u>CD44</u> : a cell-surface glycoprotein, interacts with ligands such as osteopontin, collagens, and matrix metalloproteinases, usually presents in progenitor cells	Patient derived xenograft tumors (malignant pleural effusion; primary tumor specimen)
ALDH1 ⁺	Ginestier et al. 2007	<u>ALDH1</u> : aldehyde dehydrogenase1, a detoxifying enzyme for the oxidation of intracellular aldehydes, functions in early differentiation of stem cells through its role in oxidizing retinol to retinoic acid	Patient-derived xenograft tumors (breast tumor specimen)
MARKERS DERIVED F	FROM THE CELL LINES		
MUC1 ⁺	Engelmann et al. 2008	MUC1: a transmembrane glycoprotein, mucin1, a well-known tumor antigen of breast cancer also known as CA153	MCF-7 SP (CD44+/CD24- /low)cell line
Procr ⁺ /ESA ⁺	Hwang-Verslues et al. 2009	<u>Proc</u> r: protein C receptor, a known marker of hematopoietic, neural, and embryonic stem cells. <u>ESA:</u> epithelial specific antigen, expressed in epithelial cells	MDA-MB-231, MDA-MB- 361 cell line
CD49f ⁺ /DLL1 ^{hi} /DNER ^{hi}	Pece et al. 2010	DLL1: a member of the delta/serrate/jagged family involved in cell-to-cell communication <u>DNER</u> : delta/notch- like EGF repeat containing	Cells from breast tumors (well-differentiated/G3 or poorly-differentiated breast cancer)
GD2 ⁺	Battula et al. 2012	Ganglioside <u>GD</u> 2: a glycosphingolipid, highly expressed on bone marrow- derived mesenchymal stem cells	HMLER, MDA-MB-231 cell lines
CD44 ⁺ /CD24 ^{-/lo} /ANTXR1 ⁺	Chen et al. 2013	ANTXR1: ANTXR cell adhesion molecule 1, can interact with LRP6 and VEGFR and modulate Wnt and VEGF signaling	MCF-10A, TMD-231 cell lines
ABCG2 ⁺	Leccia et al. 2014	<u>ABCG</u> 2: a transmembrane transporter, ATP- binding cassette subfamily G member 2, expressed in normal, or cancer stem cells	HCC1937 cell line (BRCA-1 mutated basal- like cell line)
Lgr5 ^{hi}	Yang et al. 2015	Lgr5: a Wnt signaling target gene, a stem cell marker overexpressed in breast cancer	MCF-7, MDA-MB-231 cell line
CD44 ⁺ CD24 ^{-/lo} SSEA-3 ⁺ or ESA ^{hi} PROCR ^{hi} SSEA- 3 ⁺	Cheung et al. 2016	<u>SSEA</u> -3: stage-specific embryonic antigen-3, the globo-series glycan	MCF-7, MDA-MB-231 cell line
Nectin-4 ⁺	Siddharth et al. 2017	<u>Nectin-4</u> : a family of immunoglobulin-like cell adhesion molecules crucial for the formation and maintenance of Cadherin-based adherens and Claudin- based tight junctions	MDA-MB-231 cell line
CD70 ⁺	Liu et al. 2018	<u>CD70</u> : a type II transmembrane protein, a member of the TNF receptor superfamily	231-LM2 cell line (a highly lung-metastatic sub-line derived from MDA-MB-231), CN34-LM1 cell line (a lung- metastatic derivative of another breast cancer cell line CN34)

Τα BCSCs ρυθμίζονται από πολλά κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, ανάμεσα στα οποία κυρίαρχο ρόλο έχουν τα μονοπάτια PI3K, Wnt, Notch, Hedgehog, JAK-STAT και NFkB. Κάποια από αυτά είναι ιδιαίτερα αυξημένα, όπως το Wnt (σε TNBC), το Notch και το Hedgehog (σε BCSCs με φαινότυπο CD44⁺/CD24⁻), και έχουν συνδεθεί με μειωμένη απόκριση στη θεραπεία του ασθενούς και αποτελούν στόχους για σχεδιασμό φαρμάκων που τα αναστέλλουν.

Ανάμεσα στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των BCSCs είναι και τα microRNAs (miRNAs). Η οικογένεια MiR-200 αποτελεί σημαντικό επιγενετικό ρυθμιστή της αύξησης και λειτουργίας των BCSCs, στοχεύοντας το BMI1 (πρωτογκογονίδιο, polycomb ring finger), το Suz12 (polycomb repressive complex 2 subunit). Συνεργατικά με άλλα miRNAs, όπως το miR-141, ρυθμίζουν την ετερογένεια των BCSCs επάγοντας την επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT) στοχεύοντας τον άξονα HIPK1 (homeodomain-interacting protein kinase 1)/β-catenin. Το Let-7 και το miR-30 συμβάλλουν στη διατήρηση της αυτο-ανανέωσης των BCSCs στοχεύοντας τις πρωτεΐνες HMGA2 (high mobility group AT-hook 2), UBC9 (ubiquitinconjugating enzyme 9) και ITGB3 (integrin b3) (Celià-Terrassa 2018) (Zhou et al. 2019).

Ετερογένεια του καρκίνου

Το πρώτο κύτταρο προέλευσης ενός καρκίνου δεν ταυτίζεται απαραίτητα με τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Μπορεί όμως να αφορά ένα σωματικό κύτταρο από τον φυσιολογικό ιστό που φέρει μεταλλάξεις, ενεργοποιείται και πολλαπλασιάζεται και στη συνέχεια, μέσω και άλλων επιγενετικών μηχανισμών, αποκτά «προβάδισμα επιβίωσης» και αναπτύσσει την κακοήθεια. Στους διάφορους τύπους συμπαγών όγκων αλλά και λευχαιμιών, το κύτταρο που εκκινεί τον όγκο υποδηλώνει καταλλήλως το κύτταρο που εκαι άλαστικά κύτταρα που τις συντηρούν. Το κύτταρο προέλευσης, η φύση των μεταλλάξεων που φέρει και το δυναμικό διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων είναι πιθανό να μπορούν να καθορίσουν εάν ένας καρκίνος ακολουθεί το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο φαινότυπος του κυττάρου προέλευσης μπορεί να διαφέρει ουσιαστικά από αυτόν των CSCs.



Εικόνα 6 Ιεραρχία του φυσιολογικού επιθηλίου του μαστού και τα προτεινόμενα κύτταρα προέλευσης για τους διαφορετικούς υπότυπους του καρκίνου του μαστού. Τα κύτταρα με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων έχουν τοποθετηθεί στη βασική στιβάδα του επιθηλίου. Διαφορετικά προγονικά κύτταρα υπάρχουν επίσης στο επιθήλιο του μαστού με σκοπό να διαφοροποιηθούν στα ώριμα κύτταρα του πόρου, του λοβού και του μυοεπιθηλίου (τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων). Η βασική μεμβράνη και το στρώμα πλούσιο σε ίνες και διάφοροι τύποι κυττάρων περιβάλλουν τη δομή. Η προτεινόμενη επιθηλιακή ιεραρχία στον μαστικό αδένα δηλώνει ότι κατά τη διαφοροποιηθούν στα ώριμα κύτταρα του πόρου, του λοβού και του στρώμα πλούσιο σε ίνες και διάφοροι τύποι κυττάρων περιβάλλουν τη δομή. Η προτεινόμενη επιθηλιακή ιεραρχία στον μαστικό αδένα δηλώνει ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ένα βλαστικό κύτταρο θα δημιουργήσει δυνητικά προγονικά κύτταρα, τα οποία θα διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε λιγότερο πολυδύναμα προγονικά κύτταρα για τη δημιουργία πόρων, λοβών και μυοεπιθηλιακών κυττάρων. Με βάση τις μοριακές ομοιότητες μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, κύτταρα από τον μαστικό αδένα στο διαφοροποίησης θα είναι τα κύτταρα προέλευσης για τους διαφορετικούς υπότυπους του καρκίνου του μαστού (Almendro and Fuster 2011).

Η φαινοτυπική και λειτουργική ετερογένεια είναι ορόσημα των καρκίνων που προκύπτουν στην πλειοψηφία των οργάνων. Ετερογένεια μπορεί να προκύπτει ανάμεσα σε όγκους που εμφανίστηκαν στο ίδιο όργανο (inter-tumoral heterogeneity) και με βάση αυτήν να καθορίζονται οι διακριτοί υπότυποι ενός καρκίνου. Κάθε υπότυπος φέρει χαρακτηριστικό γονιδιακό προφίλ, μορφολογία κυττάρων και έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών (όπως ορμονικούς υποδοχείς και αυξητικούς παράγοντες). Όσον αφορά την inter-tumoral ετερογένεια υπάρχουν δύο πιθανοί μηχανισμοί. Ο ένας αφορά τη συσσώρευση διαφορετικών γενετικών μεταλλάξεων ή επιγενετικών αλλαγών που συμβαίνουν εντός του ίδιου κυττάρου-στόχου και έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικούς φαινοτύπους. Ο άλλος αφορά την ύπαρξη διακριτών κυττάρων εντός του ιστού τα οποία αποτελούν διαφορετικά κύτταρα προέλευσης.

Παράλληλα, υπάρχει ετερογένεια και εντός των ίδιων όγκων (intra-tumoral heterogeneity), με τα καρκινικά κύτταρα εντός του όγκου να έχουν ένα εύρος λειτουργιών και διαφορετική έκφραση δεικτών. Το μοντέλο των CSCs και της κλωνικής εξέλιξης (clonal

evolution model) έχει συσχετιστεί περισσότερο με την intra-tumoral ετερογένεια και τις διαφορές στην ικανότητα αυτο-ανανέωσης του όγκου (εικόνα 7).



Εικόνα 7 Προτεινόμενο μοντέλο για κλωνική επιλογή στην υποπεριοχή του όγκου που βρίσκονται τα CSCs. Οι όγκοι θα προέρχονται από ένα κύτταρο (κλώνος τύπου βλαστικού κυττάρου 1) με εγγενή ή επίκτητα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων που μετά τον μετασχηματισμό τους πολλαπλασιάζονται (απόγονοι που μοιάζουν με στέλεχος κλώνος κυττάρου 1) και εμφανίζουν φαινοτυπική ποικιλομορφία (διαφορετικά χρώματα που περιβάλλουν τα κίτρινα κύτταρα). Τελικά, τα βλαστοκύτταρα θα αποκτήσουν νέες γενετικές αλλοιώσεις δημιουργώντας νέους κλώνους (βλαστικά κύτταρα του κλώνου 2 και 3). Εάν οι νέοι παραγόμενοι κλώνοι έχουν καλύτερη κλωνική εξέλιξη θα κυριαρχήσουν στον πληθυσμό, θα πολλαπλασιαστούν θα διαφοροποιηθούν και θα δημιουργήσουν νέους

κλώνους (απόγονοι βλαστικών κυττάρων κλώνων 2 και 3), ενώ οι τα κύτταρα με ασθενέστερο φαινότυπο θα εξαντληθούν (γκρι διακεκομμένα κυκλικά κύτταρα). Κατά την εξέλιξη του όγκου θα αποκτήσουν τα βλαστοκύτταρα επιπρόσθετες γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις, δημιουργώντας περαιτέρω κλωνική ποικιλομορφία αυξάνοντας την ετερογένεια του όγκου. Τα κυκλωμένα κυκλικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν τα βλαστοκύτταρα. Τα χωρίς κύκλο κύτταρα αντιπροσωπεύουν τους απογόνους των διαφορετικών κλώνων βλαστικών κυττάρων. Η φαινοτυπική ποικιλομορφία αντιπροσωπεύεται από το διαφορετικό χρώμα που περιβάλλει κάθε κύτταρο απόγονο (Almendro and Fuster 2011)

Επιπλέον, εξωγενείς μηχανισμοί μπορεί να εμπλέκονται στη δημιουργία ετερογένειας του όγκου, επειδή οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του είναι καθοριστικός παράγοντας της κακοήθειας (Visvader 2011). Αν και τα CSCs και τα προγονικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα, εντούτοις είναι δυνατή η επαναφορά των τελευταίων στις



Cancer stem cells

Non-cancer stem cells

Εικόνα 8 Η κυτταρική πλαστικότητα συμβάλλει στη φαινοτυπική ποικιλομορφία του καρκίνου του μαστού. Δυναμικές αμφίδρομες κυτταρικές μετατροπές συμβαίνουν μεταξύ CSCs και non-CSCs μέσα σε έναν όγκο. (Αναπαραγωγή μέρους εικόνας από Koren and Bentires-Al, 2015).

προγονικές τους μορφές. Αυτή η δυνατότητα ονομάζεται κυτταρική πλαστικότητα και συμβάλλει στη διατήρηση της κυτταρικής ισορροπίας εντός του όγκου (P. B. Gupta et al. 2011). Ποικίλες μελέτες *in vivo* και *in vitro* κατέδειξαν πως αυτή η πλαστικότητα οφείλεται είτε σε ογκογονίδια, που στη συνέχεια μπορεί να εμπλέκουν διαδικασίες όπως το EMT (επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση) και το MET (μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση), είτε και σε επιγενετικές τροποποιήσεις που καταστέλλουν ή επάγουν την μεταγραφική διαδικασία (Chaffer et al. 2013) (εικόνα 8).

Μικροπεριβάλλον

Το μικροπεριβάλλον που αναπτύσσεται ένας όγκος περιλαμβάνει κύτταρα από το στρώμα, δηλαδή μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (mesenchymal stem cells - MSCs), ινοβλάστες που αλληλεπιδρούν με τον όγκο (cancer-associated fibroblasts CAFs), λιποκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (tumor-associated macrophages - TAMs, tumor-infiltrating lymphocytes -TILs), παράγοντες της εξωκυττάριας ουσίας (ECM), αυξητικούς παράγοντες και ειδικές κυτοκίνες, συνθήκες μικροπεριβάλλοντος, όπως είναι η υποξία



Εικόνα 9 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ καρκινικών κυττάρων του όγκου και του μικροπεριβάλλοντος του (Αναπαραγωγή μέρους εικόνας από Koren and Bentires-Al, 2015).

(εικόνα 9). Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν πρωτεΐνες όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), οι χημειοκίνες CXCL7 (pro-platelet basic protein) και CCL2 (monocyte chemotactic protein-1), η αδιψίνη (adipsin) και ο παράγοντας PD-L1, συμβάλλοντας στην διατήρηση και αύξηση του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν τον παράγοντα MCSF (macrophage colonystimulating factor) ο οποίος επιδρά στα TAMs, και αυτά με τη σειρά τους εκκρίνουν τους παράγοντες TNFa και TGFβ για τη διατήρηση των CSCs. Επίσης, τα TAMs συμβάλλουν στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των CSCs μέσω του παρακρινούς μονοπατιού EGFR/Stat3/Sox-2, ενώ η αύξηση της πρωτεΐνης HAS2 (hyaluronan synthase 2) στα CD44⁺/CD24⁻/ESA⁺ BCSCs ενισχύει την αλληλεπίδραση μεταξύ των BCSCs και TAMs, ευδοκιμώντας την αύξηση του όγκου. Τα TILs τα οποία διηθούνται προς τους όγκους, εμπλέκονται επίσης στην αύξηση του όγκου, την απόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση για την πρόοδο της ασθένειας (Zhou et al. 2019). Τέλος, και τα καρκινικά κύτταρα αλλά και τα κύτταρα που τα περιβάλλουν εκκρίνουν εξωσώματα (κυστίδια μεγέθους έως 100nm) τα οποία εσωκλείουν πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, όπως τα microRNAs, ρυθμίζοντας την ομοιόσταση του καρκίνου, την ανθεκτικότητα στη θεραπεία, αλλά και τη μετέπειτα μεταστατική του συμπεριφορά (Jia et al. 2017).

ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

EMT

Οι κακοήθειες συνήθως προκύπτουν από επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται σε ένα στάδιο αποδιαφοροποίησης με κορυφαία-βασική πολικότητα και στενές συνδέσεις προσκόλλησης με τα γειτονικά κύτταρα. Η επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (ΕΜΤ) είναι μια διαδικασία που εμπλέκεται φυσιολογικά σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια αλλά και στην επουλωτική διαδικασία. Και στον καρκίνο, όμως, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταστατική εξέλιξη της νόσου (εικόνα 10). Ο όγκος του μαστού αποτελεί έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων, του οποίου το γονιδιακό προφίλ σε συνδυασμό με τα ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος, μπορεί να οδηγήσει στη διαφυγή ορισμένων κυττάρων από τον πρωτογενή όγκο και να μεταναστεύσουν σε άλλους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας του αίματος κάνοντας νέες μεταστατικές εστίες.



Εικόνα 10 Η πιθανή συμμετοχή των ΕΜΤ και ΜΕΤ στον μεταστατικό καταρράκτη. Τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στη συστημική κυκλοφορία είτε κατά συστάδες επιθηλιακών κυττάρων (collective invasion) (1), είτε μέσω μοναδιαίων μεσεγχυματικών κυττάρων (single cell migration) (2). Εναλλακτικά μπορούν να περάσουν παθητικά μέσα στην κυκλοφορία του αίματος. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), μοναδιαία ή σε συσσωματώματα (CTC- clusters) εκφράζουν κυρίως επιθηλιακούς δείκτες (Ε), ή συνεκφράζουν επιθηλιακούς και μεσεγχυματικούς δείκτες (Ε/Μ) ή μπορούν να εκφράζουν μόνο μεσεγχυματικούς δείκτες (M)(4). Τα CTCs συνήθως καλύπτονται από αιμοπετάλια, διευκολύνοντας την εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων. Σε απομακρυσμένα όργανα από τον πρωτογενή όγκο, τα CTCs που επιβιώνουν, μπορούν δυνητικά να εξαγγειωθούν όπως τα λευκοκύτταρα, στη συνέχεια να γειτνιάσουν με σταθερή πρόσφυση στα ενδοθηλιακά και να διαπηδήσουν έξω από τη κυκλοφορία του αίματος, μηχανισμός που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση (5). Τα CTCs επίσης εγκλωβίζονται λόγω μεγέθους σε στενά αγγεία, αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται μέσα στον αυλό του αγγείου (6). Προκειμένου να δημιουργήσουν μια νέα αποικία, δηλαδή να αναπτυχθούν από μικρό- σε μακρομεταστάσεις, τα μεσεγχυματικά καρκινικά κύτταρα μπορεί να χρειαστεί να υποβληθούν σε ΜΕΤ (7). Η αιματογενής εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού εμφανίζουν συγκεκριμένο τροπισμό στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο, στο συκώτι και στα οστά (Bill and Christofori 2015)

Κύτταρα από τον πρωτογενή όγκο χάνουν την πολικότητά τους και χαλαρώνουν τις συνδέσεις με τα γειτονικά κύτταρα. Έχουν μειωμένη έκφραση χαρακτηριστικών πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην κυτταρική γειτνίαση, όπως είναι η επιθηλιακή καντχερίνη 1 (CDH1/E-cadherin), η πρωτεΐνη ZO-1 (Zonula occludens-1/Tight junction protein-1), όπως και άλλες

πρωτεΐνες occludins και claudins. Την ίδια στιγμή αποκτούν ατρακτοειδή μορφή, που προσομοιάζει αυτήν των μεσεγχυματικών κυττάρων, εκφράζουν πρωτεΐνες όπως καντχερίνη 2 (CDH2/N-cadherin), φιμπρονεκτίνη (fibronectin), βιμεντίνη (vimentin), και παρουσιάζουν αυξημένες μεταναστευτικές και διεισδυτικές ικανότητες (Bill and Christofori 2015).

Διάφορα βασικά μονοπάτια σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου του μετασχηματισμού του αυξητικού παράγοντα βήτα (TGFβ), αλλά και των μονοπατιών Wnt, Notch και Hedgehog, είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στο EMT (εικόνα 11). Το μονοπάτι TGFβ μπορεί να ενεργοποιηθεί από την υπεροικογένεια των προσδετών TGFs, των οστεομορφωτικών πρωτεϊνών BMPs (bone morphogenetic proteins) και Nodal που προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς. Κατά την επαγωγή του, το μονοπάτι TGFβ χωρίζεται σε δύο οδούς: την εξαρτώμενη από SMAD και την ανεξάρτητη από SMAD. Στο SMAD-εξαρτώμενο μονοπάτι, μπορεί να γίνει επαγωγή των μεσεγχυματικών πρωτεϊνών, όπως η βιμεντίνη (vimentin). Στο μη SMAD-εξαρτώμενο μονοπάτι, η EMT διαδικασία προκαλείται μέσω των GTPάσων, του ΡΙ3Κ και του ΜΑΡΚ μονοπατιού. Επιπλέον, άλλα μονοπάτια εμπλέκονται στο ΕΜΤ, όπως τα Notch, Wnt, Hedgehog, AKT-mTOR, MAPK/ERK και NF-κB, τα οποία οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων σχετιζόμενους με ΕΜΤ (EMT-TFs). Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες SNAIL (SNAIL1, SNAIL2/SLUG), bHLH (TWIST1, TWIST2) και ZEB (Zeb1, ZEB2), οι οποίες προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (όπως το E-box) με σκοπό τη ρύθμιση γονιδίων-στόχων του ΕΜΤ (εικόνα 11). Η πρωτεΐνη CDH1 είναι ένας τέτοιος στόχος που καταστέλλεται από EMT-TFs [καθώς και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις στενές συνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων (occludins, claudins)], ενώ πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού επάγονται, όπως η βιμεντίνη, η CDH2 και η φιμπρονεκτίνη (Du and Shim 2016).



Εικόνα 11 Διαφορετικές οδοί σηματοδότησης που σχετίζονται με επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT). Τα TGFβ σήματα ενεργοποιούν τα SMAD2 και SMAD3 που είναι σε σύμπλοκο με το SMAD4. Το τριμερές σύμπλοκο των SMAD εισέρχεται στον πυρήνα και οδηγεί στη μεταγραφή των EMT παραγόντων (EMT-TFs). Η ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού καταστέλλει το GSK-3β σύμπλοκο μέσω του Disheveled (DSH), διευκολύνοντας την είσοδο της β-κατενίνης στον πυρήνα και ενεργοποιώντας τη μεταγραφή της SNAIL πρωτεΐνης. Το Notch μονοπάτι ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση των Jagged ή Delta και απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού (Notch-IC), ύστερα από πρωτεολυτική αποικοδόμηση, ενεργοποιώντας το CSL που επάγει τη μεταγραφή EMT-TFs. Στο Sonic Hedgehog μονοπάτι η ενεργοποίηση του PITCH υποδοχέα, οδηγεί σε επαγωγή του SMO (Smoothene) και του GLI (Glioma family TFs) τα οποία ενεργοποιούν τη μεταγραφή του SNAIL. Τέλος, η πρόσδεση της IL6 (ιντερλευκίνη 6) επάγει την μεταγραφή του SNAIL μέσω της ενεργοποίησης του STAT3 (Du and Shim 2016)

Επαγωγή του προγράμματος ΕΜΤ μπορεί να γίνει in vitro, υπερεκφράζοντας παράγοντες που το ρυθμίζουν, όπως η πρωτεΐνη TWIST , αλλά και χρησιμοποιώντας τον παράγοντα TGFβ. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να μελετηθεί το ΕΜΤ εξετάζοντας την ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν μέσα από πορώδεις μεμβράνες (μετανάστευση) που μπορεί να είναι καλυμμένες με τζελώδες υλικό (matrigel) το οποίο φέρει συστατικά της εξωκυττάριας ύλης (ECM) (διεισδυτική ικανότητα). Η μελέτη του EMT in vivo βασίζεται κυρίως σε μια αναδρομική ανάλυση, από ιστολογικές αναλύσεις «snapshot» των δεικτών για τη μετανάστευση και την εισβολή των κυττάρων και, ως εκ τούτου, δεν διαθέτει σημαντικές πληροφορίες για τις δυναμικές μεταβολές στις οποίες βασίζεται μια διαδικασία ΕΜΤ. Η μετανάστευση και η εισβολή καθεαυτές μπορούν να οπτικοποιηθούν μόνο από απαιτητικές τεχνικές απεικόνισης των κυττάρων σε 3D υλικά και σε πειραματόζωα. Προκλινικά μοντέλα για τη μελέτη της μετάστασης in vitro, όπως η κυτταρική σειρά MDA.MB.231, έχουν μεσεγχυματικό φαινότυπο δυσχεραίνοντας τη μελέτη της μετατροπής από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά κύτταρα. Στα διαγονιδιακά ποντίκια ΜΜΤV, που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της μετάστασης στον καρκίνου του μαστού, έχουν εντοπιστεί διάφοροι παράγοντες που σχετίζονται με την ΕΜΤ, όπως οι αυξητικοί παράγοντες TGFβ, EGF και FGF, μεταγραφικοί παράγοντες που καταστέλλουν τα γονίδια Ε-

Cadherin, TWIST1/2, SNAIL1/2, ZEB1/2 αλλά και οι συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος, όπως η υποξία.

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να μεταναστεύουν μοναδιαία (single cell migration) [εικόνα 10/(2)], είτε ως συστάδες κυττάρων (collective migration) [εικόνα 10/(1)]. Τα μοναδιαία κύτταρα μεταναστεύουν αποικοδομώντας την ECM και δημιουργώντας σημειακές προσκολλήσεις μέσω ιντεγκρινών, όπως τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Επίσης, μπορούν να μεταναστεύουν πιο γρήγορα μέσω αμοιβαδοειδούς κίνησης, απλώς συμπιέζοντας το «σώμα» τους ανάμεσα από τους ιστούς, χωρίς να συμμετέχουν ιντεγκρίνες και η αποικοδόμηση της ECM στη διαδικασία. Τέλος, μπορούν να συνδυάζουν και τους δύο τρόπους μετακίνησης, υπόθεση που έχει διαπιστωθεί σε διάφορες περιπτώσεις συμπαγών όγκων.

Οι όγκοι είναι ιδιαίτερα αγγειωμένες δομές από τις οποίες διαφεύγουν τα μεταστατικά κύτταρα. Μάλιστα, η διαδικασία ΕΜΤ επάγει την έκφραση μιας ομάδας προαγγειογόνων γονιδίων, συμβάλλοντας έτσι στην ευκολότερη διάδοση των κυττάρων αυτών μέσω της κυκλοφορίας. Τα κύτταρα που θα δημιουργήσουν νέες μεταστάσεις συνήθως είναι κύτταρα που έχουν «εγκλωβιστεί» σε μικρά αγγεία και εκεί αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, έως ότου η «νέα μάζα» εγκαθιδρυθεί στο όργανο [εικόνα 10/(6)]. Ένας άλλος τρόπος εξαγγείωσης είναι με ενεργητική μεταφορά μοναδιαίων κυττάρων δια μέσου του αγγείου και έναρξη του πολλαπλασιασμού στον περιβάλλοντα χώρο του οργάνου [εικόνα 10/(5)]. Η διαδικασία αυτή επιτελείται από μόρια προσκόλλησης, όπως ιντεγκρίνες, CD44 και N-Cadherin.

Η διαδικασία εξαγγείωσης περιλαμβάνει μια συνεργατική διαδικασία μεταξύ των καρκινικών κυττάρων με άλλα ενδοθηλιακά κύτταρα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια (Bill and Christofori 2015). Για να μπορέσουν να αναπτυχθούν νέες εστίες σε άλλα όργανα πρέπει τα καρκινικά κύτταρα να υποβληθούν σε μια αντίστροφη διαδικασία, γνωστή ως MET, κατά την οποία πρέπει να μειωθεί η έκφραση των επαγωγέων, όπως η πρωτεΐνη TWIST. Αυτό καταδεικνύει την EMT-MET ως μια δυναμική αντιστρεπτή διαδικασία η οποία ευδοκιμεί στα καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν έντονη πλαστικότητα (Tsai et al. 2012). Ο παράγοντας TGFb, για παράδειγμα, αν και συσχετίζεται με την επαγωγή του EMT, επίσης μπορεί να προκαλέσει MET σε μεσεγχυματικά καρκινικά κύτταρα μέσω επαγωγής του παράγοντα ID1, ο οποίος με κυρίαρχο αρνητικό τρόπο αναστέλλει τη δραστηριότητα του TWIST1 και αυξάνει τα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων. Η ίδια δημοσίευση προτείνει την ύπαρξη καρκινικών κυττάρων, τόσο επιθηλιακών όσο και μεσεγχυματικών, με την ικανότητα να προκαλούν τον σχηματισμό όγκων (Stankic et al. 2013).

30

Η ύπαρξη κυττάρων που φέρουν επιθηλιακά και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά, όπως τα claudin-low TNBC, και τα οποία αναπτύσσουν ιδιαίτερα επιθετικούς φαινοτύπους με κακή πρόγνωση για τον ασθενή, υποδεικνύουν ένα ημιτελές πρόγραμμα EMT το οποίο επιτρέπει στα κύτταρα να διατηρούν την πλαστικότητά τους (Bill and Christofori 2015).

Τέλος, ένα αυξανόμενο σύνολο στοιχείων δείχνει ότι η παρουσία CTCs (circulating tumor cells) σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού δεν σχετίζεται μόνο με κακή πρόγνωση, αλλά και με μειωμένη απόκριση στη θεραπεία. Πράγματι, έχουν ταυτοποιηθεί CTCs που εκφράζουν δείκτες ΕΜΤ, όπως TWIST1 και βιμεντίνη, σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα CTCs που εκφράζουν υψηλά επίπεδα μεσεγχυματικών δεικτών σχετίζονται με πιο επιθετικούς υπότυπους καρκίνου του μαστού. Η ανίχνευση CTCs που εκφράζουν μεσεγχυματικούς δείκτες και ο συσχετισμός τους με παραμέτρους κακής κλινικής έκβασης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, υποδηλώνει τη σημασία του ΕΜΤ στη διαδικασία ενδοαγγείωσης των κυττάρων. Εναλλακτικά, το ΕΜΤ μπορεί επίσης να προκληθεί αφού τα κύτταρα εισέλθουν στην κυκλοφορία μέσω παραγόντων που προκαλούν EMT, όπως το TGFb που εκκρίνεται από αιμοπετάλια που προσκολλώνται σε μοναδιαία αλλά και σε συστάδες (clusters) CTCs. Αν και τα clusters CTCs είναι γνωστό από καιρό ότι είναι σημαντικοί συντελεστές στο σχηματισμό μεταστάσεων, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι στα μοντέλα μεταμόσχευσης καρκίνου του μαστού, αντιπροσωπεύουν μόνο το 2–5% περίπου των CTCs συνολικά και είναι υπεύθυνα για περίπου του 50% των μεταστάσεων στον πνεύμονα, ενώ μπορεί να συνεκφράζουν επιθηλιακούς και μεσεγχυματικούς δείκτες (Μ. Yu et al. 2013) (Bill and Christofori 2015).

Οργανοτροπισμός

Περισσότεροι από το 80% των μεταστατικών καρκίνων του μαστού προέρχονται από κύτταρα του αυλού (Invasive ductal carcinomas-IDCs), ενώ οι υπόλοιποι προέρχονται από κύτταρα των λοβών (Invasive lobular carcinomas-ILCs). Τα IDCs έχουν την τάση να κάνουν μεταστάσεις στους πνεύμονες, στους κοντινούς λεμφαδένες και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ τα ILCs στο περιτόναιο, στους γαστρεντερικούς αδένες και στις ωοθήκες (Chen et al. 2018).

Οι μεταστάσεις δεν εμφανίζονται τυχαία αλλά μάλλον προκύπτουν σε προτιμώμενες τοποθεσίες υπό τον έλεγχο ενός πλήθους μικροπεριβαλλοντικών, κυτταρικών και μοριακών παραγόντων. Στο παρελθόν, δύο ήταν οι επικρατείς υποθέσεις για να την εξήγηση των μεταστατικών προτύπων. Η μία υπόθεση δηλώνει ότι η κυκλοφορία του αίματος υποδηλώνει σε ποιες περιοχές είναι πιθανό να φιλοξενηθούν κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) και ότι αυτά τα CTCs μπορεί να εγκλωβίζονται μηχανικά στα τριχοειδή που

31

συναντούν και να αναπτύσσουν εκεί νέες εστίες [εικόνα 10(6)]. Όμως, η ύπαρξη οργάνων που έχουν την ίδια παροχή αίματος, αλλά εμφανίζουν διαφορετικό μοτίβο μεταστάσεων, υποδηλώνει πως η μηχανική αυτή τοποθέτηση των CTCs δεν εξηγεί όλες τις περιπτώσεις. Ειδικά εφόσον στον καρκίνο του μαστού οι μεταστάσεις σε νεφρούς, ουρήθρα και σπλήνα είναι σπάνιες. Έτσι, αναπτύχθηκε η άλλη υπόθεση που αφορά την «σπορά και το έδαφος», υποδεικνύοντας τους «σπόρους» ως τα κύτταρα από τον πρωτογενή όγκο και το «έδαφος» ως το κατάλληλο μικροπεριβάλλον σε άλλα όργανα για την ανάπτυξη μεταστάσεων. Οι δύο υποθέσεις λειτουργούν συνεργατικά για την εξήγηση του οργανοτροπισμού. Μάλιστα, παλαιότερες αναλύσεις έχουν κατηγοριοποιήσει τον οργανοτροπισμό που εμφανίζουν οι μεταστάσεις με βάση τον μοριακό υπότυπο του καρκίνου του μαστού. Για παράδειγμα, μεταστάσεις στον πνεύμονα εμφανίζουν πιο συχνά οι υπότυποι basal-like TNBC ενώ στα οστά οι υπότυποι Luminal A και Β.

Πρόσφατες μελέτες επικεντρώνουν την προσοχή τους στους μοριακούς παράγοντες που έχουν καταλυτικό ρόλο στη μετάσταση του καρκίνου του μαστού και αφορούν τη επικοινωνία μεταξύ κυττάρων με την εξωκυττάρια ύλη (extracellular matrix - ECM), όπως μόρια σηματοδότησης και μόρια προσκόλλησης, κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες, καθώς και οι ρυθμιστές, οι αναστολείς και οι υποδοχείς τους. Έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα γονίδια που εκφράζονται από τα καρκινικά κύτταρα του μαστού και από το μικροπεριβάλλον τους, τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν τις κατάλληλες συνθήκες για τις προμεταστατικές περιοχές. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται σε διαφορετικά στάδια της μετάστασης και έχουν ομαδοποιηθεί στα εναρκτήρια της μετάστασης (που ενισχύουν την αύξηση του όγκου και την αγγειογένεση), τα γονίδια εξέλιξης της μετάστασης (που οδηγούν σε διεγερτικά ερεθίσματα στον πρωτογενή όγκο και στις προμεταστατικές εστίες) και τα οποίλα που αλαφορα όργανα (που δίνουν το πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού των κυττάρων στη μεταστατική εστία σε σχέση με τον πρωτογενή όγκο) (πίνακας 5). Όλα αυτά δημιουργούν ένα δυναμικό, πολύπλοκο και διαδραστικό δίκτυο που ρυθμίζει τον οργανοτροπισμό των μεταστάσεων (Yousefi et al. 2018).

Process	Functions	Genes			
Metastasis initiation	Local invasion	Metastasis initiation genes			
	Angiogenesis	Homeobox B7 (HOXB7) and Six1			
	Epithelial-mesenchymal transition (EMT) Intravasation	Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)			
		Inhibitor of differentiation (ID1 and ID3)			
		X-box binding protein1 (XBP1)			
		Anterior gradient 2 (AGR2)			
Metastasis	Circulation	Metastasis progression genes			
progression	Extravasation Immune recruitment	Epiregulin (EREG)			
		Prostaglandin endoperoxide synthase 2/cyclo-oxygenase II (PTGS2/COX2)			
		Matrix metalloproteinases (MMP-1, -2, -3 and -10)			
		CCLs (CCL2, 3, 5, 17, 21 and 22)			
		Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)			
		Angiopoietin 2 (Angpt2)			
		Metadherin (MTDH) CXCL12–CXCR4			
		CXCL1			
		Osteopontin (OPN)			
		Kruppel-like factor 17 (KLF17)			
		Interleukin-13 decoy receptor (IL13Ra2)			
		Epidermal growth factor (EGF)			
		Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)			
		VEGFR1, CCR2, and CX3CR1			
Metastasis virulence	Survival at distance	Metastasis virulence genes			
	Tumor outgrowth Metastatic colonization	Secreted protein, acidic, cysteine-rich/osteonectin (SPARC)			
		Lysyl oxidase (LOX)			
		Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)			
		Colony stimulating factor 1 (CSF-1)			
		CXCL12-CXCR4			
		Matrix metalloproteinases (MMP-2)			
		Tenascin-C (TNC)			
		VLA-4 (α4β1 integrin)			

Πίνακας 5 Γονίδια που εκφράζονται στα βασικά στάδια που αφορούν τη δημιουργία μεταστάσεων στον καρκίνο του μαστού(Yousefi et al. 2018)

Οι γονιδιακές υπογραφές και τα χαρακτηριστικά σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν έχουν προκύψει από τη μελέτη πρωτογενών όγκων και μεταστάσεων και συμβάλλουν στην πρόγνωση του οργανοτροπισμού των CTCs. Σε γενικές γραμμές το μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων που οδηγούν σε ανάπτυξη καρκίνου στα οστά και στους πνεύμονες είναι διακριτό ανάμεσα στα δύο όργανα (Chen et al. 2018). Για τις οστικές μεταστάσεις περιλαμβάνονται γονίδια που αφορούν εκκριτικές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην οστεολυτική διαδικασία επηρεάζοντας το μικροπεριβάλλον του οστικού ιστού, ενώ για τις πνευμονικές μεταστάσεις τα γονίδια σχετίζονται με την ενισχυμένη αύξηση του όγκου και την αυξημένη διεισδυτικότητα των κυττάρων, όπως είναι η φασκίνη (FASCIN) και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases - MMPs). Παράγοντες που συμμετέχουν στον οργανοτροπισμό του όγκου περιλαμβάνουν τους TGFβ, IGF1, COX2, Dikkopf και άλλους, οι οποίοι συμμετέχουν στην ενδοεπικοινωνία μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του οργάνου όπου θα δημιουργηθούν οι μεταστάσεις (van 't Veer et al. 2002; Kang et al. 2003; Minn et al. 2005).

Τα CSCs έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη μεταστάσεων στον πνεύμονα, στα οστά και στο ήπαρ και αυτό ίσως γιατί σε εκείνα τα όργανα εκφράζονται η υαλουρονάνη (hyaluronan - HA) και η οστεοποντίνη (osteopontin - OPN). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι προσδέτες του CD44, ο οποίος εκφράζεται από τα BCSCs, προσελκύοντάς τα έτσι να κάνουν μεταστάσεις στα συγκεκριμένα όργανα. Το ίδιο ισχύει και για τον υποδοχέα CXCR4, του οποίου ο προσδέτης SDF-1 εκφράζεται στα όργανα αυτά. Κατά ανάλογο τρόπο, τα BCSCs αλληλεπιδρούν και με το μικροπεριβάλλον των οργάνων δημιουργώντας τις προμεταστατικές περιοχές, για παράδειγμα μέσω των αναστολέων της διαφοροποίησης (παράγοντες ID1 και ID3) που εκφράζονται από τα TNBCs στο παρέγχυμα του πνεύμονα αναπτύσσοντας μεταστάσεις εκεί (Yousefi et al. 2018). Τα κυκλοφορούντα CTCs «προστατεύονται» λόγω των προσκολλημένων αιμοπεταλίων από τα natural killer (NK) κύτταρα του ανοσοποιητικού απελευθερώνοντας TGFβ και PDGF και σχετίζονται με μεταστάσεις του καρκίνου του μαστού στα οστά και στον πνεύμονα, ενώ η έκφραση του PDFRα σχετίζεται με μεταστάσεις στους λεμφαδένες. Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει επίσης καταλυτικό ρόλο στη δημιουργία μεταστάσεων με την προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως μονοκύτταρα και μακροφάγα, τα οποία «οχυρώνουν» τα καρκινικά κύτταρα από τη δράση των natural killer (ΝΚ) κυττάρων και συμβάλλουν στη δημιουργία προμεταστατικών περιοχών (Chen et al. 2018).

Μια άλλη κατηγορία μορίων που εμπλέκονται στον οργανοτροπισμό αφορά τα εξωσώματα (exosomes). Τα εξωσώματα είναι μεμβρανικά κυστίδια (30-100nm) τα οποία περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, miRNAs, DNA και λιπίδια και εκκρίνονται από τα κύτταρα, καρκινικά ή μη, συμμετέχοντας ενεργά στον οργανοτροπισμό. Στη μελέτη των Hoshino και των συνεργατών της, χαρακτηρίστηκε μια ομάδα ιντεγκρινών που εκκρίνονταν μέσω των εξωσωμάτων από τα καρκινικά κύτταρα σε διαφορετικά όργανα, με σκοπό την προετοιμασία του μικροπεριβάλλοντος για την ανάπτυξη μεταστάσεων. Πιο συγκεκριμένα, τα εξωσώματα που περιελάμβαναν την ιντεγκρίνη ανβ5 προσλαμβάνονταν από τα ηπατικά Kupffer κύτταρα και εκεί αναπτύσσονταν ηπατικές μεταστάσεις. Εξωσώματα με τις ιντεγκρίνες α6β4 και α6β1 προσλαμβάνονταν από ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα αντίστοιχα, προετοιμάζοντας τις πνευμονικές μεταστάσεις επάγωντας την S100 πρωτεΐνη (Hoshino et al. 2015).

Πολλά, επίσης, μικρά RNA εμπλέκονται στη διαδικασία της μετάστασης και της «προτίμησης» που θα εμφανίσουν τα κύτταρα για να δημιουργήσουν μεταστάσεις. Το miR-

34

10b και το miR-122 εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα μαστού και εμπλέκονται στη ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος του εγκεφάλου και του πνεύμονα με σκοπό τη δημιουργία μεταστάσεων εκεί. Το miR-105 ρυθμίζει την πρωτεΐνη ZO-1 που συμμετέχει στις στενές συνδέσεις των κυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, επάγοντας τις πνευμονικές και εγκεφαλικές μεταστάσεις. Άλλα miRNAs όπως το miR-30, το miR-7 και το miR-495 ρυθμίζουν τα CSCs και την ικανότητα τους να δημιουργούν μεταστάσεις. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε σε δείγματα ασθενών αναφορικά με την ύπαρξη συγκεκριμένων μικρών RNA στους πρωτογενείς όγκους του μαστού και τις μεταστάσεις που είχαν εμφανίσει, το miR-106b-5p σχετίστηκε με πνευμονικές μεταστάσεις υποδεικνύοντας πως και τα μικρά RNA μπορεί να αποτελούν χρήσιμο προγνωστικό εργαλείο για τη εξέλιξη της νόσου (Chen et al. 2018; Schrijver, van Diest, and Moelans 2017).

Πρωτεΐνη της Προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Promyelocytic Leukemia protein– PML)

Το γονίδιο της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Promyelocytic Leukemia - PML) περιγράφηκε αρχικά στις αρχές της δεκαετίας του 1990 στο σημείο της χρωμοσωμικής μετατόπισης t(15, 17) που στην περίπτωση αυτή κωδικοποιεί μια ογκογόνο χιμαιρική πρωτεΐνη, η οποία έχει προκύψει από την σύντηξη του PML γονιδίου και του RARa υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (Acute Promyelocytic Leukemia-APL) (εικόνα 12). Η PML-RAR πρωτεΐνη μπλοκάρει την επαγωγή της μεταγραφής από το RARa και διαταράσσει τα πυρηνικά σωμάτια PML που σχηματίζει η PML. Τελικά οδηγεί στην καταστολή της διαφοροποίησης των μυελικών προγονικών κυττάρων, συμβάλλει στην αυτο-ανανέωση τους και εμποδίζει την αποπτωτική διαδικασία (Kakizuka et al. 1991; H de Thé et al. 1991; Hugues de Thé and Chen 2010).


Εικόνα 12 (a) Δομή των πρωτεϊνών προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (PML) και του υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος-α (RARa), μαζί με τη χιμαιρική PML-RARa. Φαίνονται οι περιοχές RING (R), B box (B) και coil-coil (CC) στο PML. Φαίνεται η DNA περιοχή πρόσδεσης του DNA για το RARa (C) και η ορμονική περιοχή πρόσδεσης (Ε). Τα Α, Β, D και F είναι άλλες ρυθμιστικές περιοχές. Η PML–RARa διατηρεί τα λειτουργικές περιοχές και των δύο πρωτεϊνών, επιτρέποντας επικρατείς-αρνητικές δράσεις τόσο για την PML όσο και για τον RARa(Hugues de Thé and Chen 2010). (b) Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου PML. Το κύριο μετάγραφο του PML περιέχει εννέα εξόνια και οκτώ ιντρόνια και είναι εναλλακτικά ματισμένο. Τα εξόνια εμφανίζονται ως μπλε κουτιά. Το αρχικό αντίγραφο του PML με εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να δημιουργήσει περισσότερες από 11 ισομορφές. Εμφανίζονται μόνο επτά ισομορφές του ΡΜL με κοινά τα εξόνια 1-4. Όλες οι πυρηνικές ισομορφές (Ι – VI) έχουν τα εξόνια 1-6. Οι ισομορφές ΙΙΙ και V περιέχουν ιντρόνια χρωματισμένα σε γκρι και είναι διαχωρισμένα σε άλλες πυρηνικές ισομορφές. Οι αστερίσκοι σηματοδοτούν τις περιοχές από μερικά εξόνια ή ιντρόνια. Σε αυτό το Σχήμα, φαίνεται επίσης ο εντοπισμός τους, το μοριακό βάρος των ισομορφών της πρωτεΐνης PML και τα μεγέθη του 3'-UTR κάθε ισομορφής PML. Οι ισομορφές του PML γονιδίου περιλαμβάνουν μοναδικά 3'-UTRs, με ένα κοινό μέρος 140 - bp (ζεύγη βάσεων) 5'-UTR που περιέχει ένα λειτουργικό IRES. SIM: SUMO μοτίβο αλληλεπίδρασης, NLS: αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού, NES: αλληλουχία εξόδου από τον πυρήνα(Kuo-Sheng Hsu and Kao 2018).

Το γονίδιο PML εκφράζεται στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, χωρίς να διατηρείται εξελικτικά η πρωτεΐνη σε άλλα είδη (Borden 2002). Η πρωτεΐνη PML ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεΐνών που φέρουν ένας τριμερές μοτίβο (tripartite motif family - TRIM) και περιλαμβάνει περισσότερες από 70 πρωτεΐνες στον άνθρωπο. Χαρακτηρίζονται από μια συντηρημένη περιοχή RBCC (RING/B box/coiled-coil), η οποία διατηρείται σε όλες τις ισομορφές της PML (εικόνα 12). Το μοτίβο RBCC έχει τρεις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη και φέρει θέσεις πρόσδεσης ψευδαργύρου, ένα RING δακτύλιο (R), δύο B box (B) και μια περιελιγμένη α-έλικα (CC) κοντά στο αμινοτελικό άκρο το οποίο είναι κοινό σε όλες τις ισομορφές (Borden 2008) (εικόνα 12).

Η περιοχή RBCC μεσολαβεί για την πραγματοποίηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και τη δημιουργία των πυρηνικών σωματίων της PML (PML nuclear bodies - PML-NBs). Το αρχικό μετάγραφο της PML περιέχει 9 εξόνια και με εναλλακτικό μάτισμα μπορούν να

προκύψουν διάφορες ισομορφές με διαφορετικά καρβοξυτελικά άκρα. Σύμφωνα με την κλασσική ονοματολογία Janssen, οι ισομορφές της PML ταξινομούνται ως PMLI έως PMLVII. Η πυρηνική αλληλουχία (NLS) στον εξόνιο 6 δεν υπάρχει στην ισομορφή VII και αυτό την καθιστά αποκλειστικά κυτταροπλασματική. Η μεγαλύτερη ισομορφή, PML I, έχει μια αλληλουχία εξόδου από τον πυρήνα (NES) στο εξόνιο 9. Προφανώς, αυτή η ισομορφή είναι ικανή να μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Στο εξόνιο 7, υπάρχει ένα τετραπεπτίδιο με μια αλληλουχία αμινοξέων VVVI και είναι γνωστή ως SUMO μοτίβο αλληλεπίδρασης (SUMO-interacting motif - SIM), λόγω της ικανότητάς του να δεσμεύει σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες (Kuo-Sheng Hsu and Kao 2018) (εικόνα 12).

Ρύθμιση της πρωτεΐνης PML

Η PML πρωτεΐνη είναι αισθητήρας του κυτταρικού στρες και άλλων περιβαλλοντικών σημάτων, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων και των κυτοκινών. Η αφθονία της πρωτεΐνης PML ρυθμίζεται μεταγραφικά, μεταφραστικά και μεταμεταφραστικά, ως απόκριση στο κυτταρικό στρες. Επιπλέον, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση παίζει ρόλο-κλειδί στη ρύθμιση PML και έχει μελετηθεί έντονα. Η τροποποίηση της PML διαταράσσει τα PML-NBs και την αλληλεπίδραση της PML με άλλες πρωτεΐνες (Kuo-Sheng Hsu and Kao 2018).

Μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση του PML γονιδίου

Η μεταγραφική ρύθμιση του PML είναι ένας κρίσιμος μηχανισμός για τα κύτταρα, ώστε να ανταποκρίνονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Και οι δύο τύποι ιντερφερονών (IFNs type I and II) έχουν αποδειχθεί ότι επάγουν την μεταγραφή του mRNA του PML γονιδίου μέσω του μονοπατιού JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) και των cis-στοιχείων στον PML υποκινητή, συμπεριλαμβανομένων των αλληλουχιών ISRE (IFN stimulated response -GAGAATCGAAACT-) και GAS (gamma activated sites-TTTACCGTAAG-) (Chelbi-Alix et al. 1995; Stadler et al. 1995). Η πρωτεΐνη p53, επίσης, μπορεί να προσδένεται στην κωδική περιοχή του γονιδίου PML και ρυθμίζει τη μεταγραφή του. Όταν επάγεται η p53 από τη RAS, ρυθμίζει την PML προάγοντας την καρκινική κυτταρική γήρανση (Ferbeyre et al. 2000; de Stanchina et al. 2004). Η β-κατενίνη μαζί με την πλακοσφαιρίνη ρυθμίζουν την PML ενεργοποιώντας τον υποκινητή του γονιδίου της (Shtutman et al. 2002). Οι πρωτεΐνες STAT3 και STAT6 καταστέλλουν την έκφραση της PML κατά την ανάπτυξη του μαστικού αδένα (Wenjing Li et al. 2009). Αντίθετα, έχει προταθεί ότι η STAT3 επάγει την PML στα TNBC σε υποξικές συνθήκες (Martín-Martín et al. 2016; Ponente et al. 2017). Η PML ρυθμίζεται και μετα-μεταγραφικά. Εναλλακτικό μάτισμα του πρωτογενούς mRNA δημιουργεί πολλαπλές ισομορφές PML με μοναδικά 3'-UTRs (εικόνα 12C). Πρόσφατη μελέτη ανέδειξε τη μείωση της συσσώρευση της ισομορφής PMLI μέσω του miR-1246 στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου (Yamada et al. 2014). Από την άλλη μεριά η υπερέκφραση της K-RAS ενισχύει τη μετάφραση του PML μέσω του mTOR/eIF4Eστο 5'-UTR (Scaglioni et al. 2012). Τέλος, ο υποκινητής PML φέρει ένα IRES (1000nt internal ribosome entry site) το οποίο ενεργοποιείται από τον άξονα p38-MNK1 με σκοπό την αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης (K-S Hsu et al. 2016).

Μετα-μεταφραστική ρύθμιση του PML.

Η πρωτεΐνη PML είναι ομοιοπολικά συζευγμένη με μικρές πρωτεΐνες-τροποποιητές, συμπεριλαμβανομένης της ουμπικιτίνης, SUMO και πιθανώς της ISG15. Αυτές οι τροποποιήσεις απαιτούν ξεχωριστές λιγάσες E1/E2/E3. Τρεις λυσίνες, K65, K160 και K490, έχουν ταυτοποιηθεί ως τα κυριότερα σημεία σουμοϋλίωσης (Kamitani et al. 1998). Τέσσερις πρωτεΐνες της οικογένειας SUMO (SUMO1, SUMO2, SUMO3 και SUMO5) σουμοϋλιώνουν την PML σε διαφορετικές λυσίνες με διαφορετικές λειτουργικές συνέπειες για το κύτταρο. Δεδομένου ότι η σουμοϋλίωση της PML είναι σημαντική για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, η σουμοϋλίωση είναι απαραίτητη διαδικασία για τη δημιουργία των PML-NBs (Lallemand-Breitenbach and de Thé 2010). Αντιστοίχως, οι SUMO-ειδικές επίσης παράγοντες που προκαλούν καταστροφή του DNA και παράγοντες που προκαλούν κυτταρικό στρές, όπως το τριοξείδιο του αρσενικού (As₂O₃) ρυθμίζουν τη σουμοϋλίωση του PML (Dellaire et al. 2006; Weisshaar et al. 2008; X.-W. Zhang et al. 2010).

Η αφθονία της πρωτεΐνης PML ρυθμίζεται από την αντιστρεπτή διαδικασία ουμπικιτινιλίωσης μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές E3 λιγάσες που προάγουν την πολυ-ουμπικιτινιλίωση και την αποικοδόμηση της PML από το πρωτεάσωμα. Οι E6AP (Ubiquitin E3 λιγάση), SIAH1 και SIAH2 (RING-finger ubiquitin E3 λιγάση) επάγουν την αποικοδόμηση της PML, όπως και η KLHL20 (E3 υπομονάδα λιγάσης) που προωθεί την αποικοδόμηση της PML μέσω CDK2 και Pin1. Οι παράγοντες RNF (οικογένεια λιγάσης E3 ουμπικιτίνης σε κύτταρα θηλαστικών) περιέχουν μοτίβο SIM. Στα κύτταρα APL που υποβλήθηκαν σε αγωγή με As₂O₃, η SUMO λιγάση PIAS1 προάγει την συσσώρευση της PML και διευκολύνει την στρατολόγηση των παραγόντων RNF4/RNF111 στο PML για πολυ-ουμπικιτινιλίωση και αποικοδόμηση. Μέσω του μοτίβου SIM στο καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal SIM), το PML μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της ίδιας της PML (Fanelli et al. 2004; Geoffroy et al. 2010; Louria-Hayon et al. 2009; Shen et al. 2006; Yuan et al. 2011).

Έχει επίσης προταθεί ότι η πρωτεΐνη PML μπορεί να τροποποιηθεί με την πρόσδεση της ISG15 (Isgylation). Η μικρή αυτή SUMO πρωτεΐνη επάγεται από ιντερφερόνες τύπου Ι, τον λιποπολυσακχαρίτη ή κάποια ιογενή λοίμωξη. Η επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου ενεργοποίησης ουμπικιτίνης τύπου E1 (UBE1L) από το ρετινοϊκό οξύ (RA), ενισχύει την πρόσδεση του ISG15 στο PML στην PML/RARa πρωτεΐνη, προκαλώντας την αποικοδόμησή της. Κατά συνέπεια, η μειωμένη έκφραση του USP18 που απομακρύνει την ISG15, οδηγεί σε αυξημένη isgylated-PML/RARa προκαλώντας μείωση της PML/RARa και απόπτωση των κυττάρων APL. Συνοπτικά, η Isgylation της PML μπορεί να συμβάλλει στη διαδικασία αποικοδόμησής της (Y. Guo et al. 2010; Shah et al. 2008).

Η φωσφορυλίωση της PML είναι μια σημαντική λειτουργία για τον σχηματισμό των PML-NBs ως απόκριση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα, όπως οι αυξητικοί παράγοντες και διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις, όπως τα μιτογόνα, οι βλάβες στο DNA και το ογκογονικό στρες. Βλάβες στο DNA λόγω έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία ή σπασίματα στη διπλή έλικα προκαλούν αλλαγές στη χρωματίνη, με αποτέλεσμα τα PML-NBs να αυξάνονται σε αριθμό αλλά να μικραίνουν σε μέγεθος και να αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη (Dellaire et al. 2006). Στην τελευταία φάση της επιδιόρθωσης του DNA (DNA damage response - DDR), τα μικρά PML-NBs φαίνεται ότι βοηθούν στην επιδιορθωτική διαδικασία και ρυθμίζονται από τις DNA κινάσες Chk2, ATM και ATR. Στην περίπτωση της UV ακτινοβολίας, η Chk2 φωσφορυλιώνει την PML στο κατάλοιπο S117, επάγοντας την απόπτωση. Μετά από βλάβη του DNA από την δοξορουβικίνη, η PML φωσφορυλιώνεται από την ATR και συσσωρεύεται στους πυρηνίσκους, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση της MDM2 με την p53, οδηγώντας στην σταθεροποίηση της p53 (Bernardi et al. 2004) (Yang et al. 2002). Το ΗΙΡΚ2 φωσφορυλιώνει την PML στα κατάλοιπα S8 και S38, ακολουθούμενη από σουμοϋλίωση της PML, σταθεροποίηση και μετά απόπτωση των κυττάρων. Ομοίως, έχουν εντοπιστεί αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης της PML από τις κινάσες ERK1 και ERK2 οι οποίες συμβάλλουν στη σουμοϋλίωση της PML, ύστερα από επαγωγή της απόπτωσης με As₂O₃. Σε συνθήκες υποξίας, οι κινάσες CDK1/2 φωσφορυλιώνουν την PML στην S518, οδηγώντας την προς αποικοδόμηση. Δεδομένου ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης PML κυμαίνονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, εκτός από τις CDK1/2, η κινάση Aurora A μπορεί να φωσφορυλιώνει την PML σε διάφορες θέσεις σερίνης και έτσι η PML μπορεί να εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (Dephoure et al. 2008; Gresko et al. 2009).

39

PML πυρηνικά σωμάτια (PML-NBs)

Τα PML-πυρηνικά σωμάτια (PML-NBs), που αρχικά λέγονταν Kremer bodies, ονομάστηκαν έτσι από την PML πρωτεΐνη επειδή αποτελεί το βασικό συστατικό τους. Είναι διακριτές πυρηνικές σφαιρικές δομές, μεγέθους 0,2-1,0 μm, που υπάρχουν στα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών, ενώ τυπικά ο αριθμός τους είναι 1–30 σωμάτια ανά πυρήνα, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, τη φάση του κυτταρικού κύκλου και το στάδιο διαφοροποίησης του κυττάρου (Bernardi and Pandolfi 2007). Είναι σημαντικό ότι, αν και όλες οι ισομορφές της PML σχηματίζουν PML-NBs, όταν αυτές εκφράζονται μεμονωμένα σε κύτταρα PML^{-/-}, σχηματίζουν διαφοροποιημένα PML-NBs όσον αφορά τον αριθμό, το μέγεθος και την τοπολογία τους (Brand, Lenser, and Hemmerich 2010; Hands et al. 2014).

Κατά τον σχηματισμό των PML-NBs, οξειδωμένα μονομερή της PML επιτρέπουν το σχηματισμό πολυμερών συνδεδεμένων με δισουλφιδικούς δεσμούς, δημιουργώντας το εξωτερικό κέλυφος του σωματίου. Εξίσου σημαντικός είναι και ο διμερισμός μέσω των RBCC μοτίβων με ομοιοπολικούς δεσμούς για τον σχηματισμό ενός PML-NBs. Στη συνέχεια, η λιγάση UBC9 επάγει την πολυ-SUMOυλίωση και την αλληλεπίδραση μεταξύ SUMOπρωτεϊνών που φέρουν SIM μοτίβα. Τα συσσωματώματα που δημιουργούνται αλληλεπίδρούν μεταξύ τους, δημιουργώντας ένα ολοκληρωμένο PML-NB το οποίο στην περιφέρεια του έχει 6 διαφορετικές ισομορφές της PML, τα SIM μοτίβα τους και τις πολυ-SUMOυλιωμένες αλυσίδες του (εικόνα 13) (Hoischen et al. 2018).



Εικόνα 13 Η συναρμολόγηση των PML-NBs ξεκινά με τον ολιγομερισμό οξειδωμένων μη-SUMOυλιώμενων PML μονομερών με μη ομοιοπολικούς δεσμών μέσω των RBCC μοτίβων και μέσω ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ κυστεϊνών. Στη συνέχεια η λιγάση UBC9 προωθεί την πολύ SUMOυλίωση των PML στα σωμάτια, η οποία επιτρέπει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ SUMO-πρωτεϊνών που φέρουν SIM μοτίβα με σκοπό τη δημιουργία συσσωμάτων. Τα συσσωματώματα αυτά μπορούν να συνδεθούν για να σχηματίσουν ένα ολοκληρωμένο PML-NB που βασίζεται στην αυτοοργάνωση.(Hoischen et al. 2018)

Το μοντέλο δημιουργίας των PML-NBs βασίζεται στον βιοφυσικό μηχανισμό του διαχωρισμού υγρής-υγρής φάσης, σύμφωνα με τον οποίο μπορούν να σχηματίζονται συμπυκνωμένα σταγονίδια μέσα στο νουκλεόπλασμα όταν η συγκέντρωση των βιομορίων είναι πάνω από ένα όριο. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ SUMO και SIM στα PML-NBs δημιουργούν τέτοια σταγονίδια μέσα στον πυρήνα του κύτταρου τα οποία δεν περιβάλλονται από μεμβράνη (Banani et al. 2016; Uversky 2017).

Τα PML-NBs ρυθμίζουν ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες σε διάφορα επίπεδα. Σε μεταγραφικό επίπεδο, τα PML-NBs μπορούν να αλληλεπιδρούν κατευθείαν με τη χρωματίνη, όπως για παράδειγμα με την πρόσδεση στον γενετικό τόπο MHC class I (Kumar et al. 2007) ή την πρόσδεση των PML-NBs κατευθείαν στο γονίδιο TP53 ρυθμίζοντας τη μεταγραφή του (Y. Sun, Durrin, and Krontiris 2003). Επίσης, τα PML-NBs συγκρατούν μεταγραφικούς παράγοντες εμποδίζοντας την πρόσβασή τους στη χρωματίνη, όπως ο CBP, ο DAXX και το RB (Bernardi and Pandolfi 2007; Khan et al. 2001; Salsman et al. 2017). Πολλές είναι οι πυρηνικές πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με τα PML-NBs (Van Damme et al. 2010) και να συμμετέχουν σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αλλά και σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, συμμετέχοντας σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η απόπτωση, η πυρηνική πρωτεόλυση, η κυτταρική γήρανση, η ικανότητα αυτοανανέωσης των κυττάρων, η απόκριση στις βλάβες του DNA, η σταθερότητα των τελομερών, η γονιδιακή και η επιγενετική ρύθμιση. Παράδειγμα αποτελούν η ακετυλίωση και η απακετυλίωση της p53 από το CBP και τη Sirt1, αντίστοιχα, στα PML-NBs (Hofmann et al. 2002; Langley et al. 2002), καθώς και η αποφωσφορυλίωση του RB από τον PP2A που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Regad et al. 2009). Τέλος, η αποφωσφορυλίωση του pAkt από τον PP2A στα PML-NBs αποτελεί έναν από τους ογκοκατασταλτικούς μηχανισμούς που δρα η PML μέσω των PML-NBs (Trotman et al. 2006). Η υπερέκφραση της PMLIV, ενεργοποιεί την κυτταρική γήρανση από το p53. Πιο συγκεκριμένα αλληλεπιδρά μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ARF με σκοπό τη SUMΟυλίωση της p53 και την επακόλουθη σταθεροποίηση της (Ivanschitz et al. 2015). Η συμμετοχή σε τόσες κυτταρικές λειτουργίες σχετίζεται και με τη σταθερότητα που προσδίδουν τα PML-NBs ως υπόστρωμα για αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (εικόνα 14).



Εικόνα 14 Figure 1.9: Πρωτεΐνες που «προσδένονται» στα PML-NBs και αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες συμμετέχοντας σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες.(Hoischen et al. 2018)

PML στη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων

Η έκφραση της PML είναι υψηλή στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) και μειώνεται καθώς αυτά διαφοροποιούνται. Στην μελέτη του Ιto και των συνεργατών του διαπίστωσαν επίσης ότι ο αριθμός των PML-NBs ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα. Το PML ρυθμίζει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των HSCs μέσω του μονοπατιού της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης (PI3K)/Akt (Ito et al. 2012), ενώ ταυτόχρονα δρα και ογκοκατασταλτικά μέσω της αλληλεπίδρασης PI3K/Akt/mTOR σε πολλαπλά επίπεδα (Trotman et al. 2006)(Bernardi et al. 2006)(Song et al. 2008). Η PML ρυθμίζει την ασύμμετρη διαίρεση και τη συντήρηση των HSCs, προκαλώντας απακετυλίωση του PPARy coactivator 1A (PGC1A), η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PPAR και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (fatty acid oxidation - FAO). Το FAO αυξάνει την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των HSCs, επιτρέποντας την αυτο-ανανέωση και τη συντήρησή τους. Όταν το FAO αναστέλλεται φαρμακολογικά από την ετομοξίρη (etomoxir), τα HSCs υποβάλλονται σε συμμετρική δέσμευση και εξαντλούνται. Πράγματι, η απαλοιφή του PPARδ ή της PML, καθώς και η αναστολή του FAO, έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των HSCs, ενώ η ενεργοποίηση του PPARδ αυξάνει την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση που υποδηλώνει ότι ο άξονας PML-PPARδ-FAO ρυθμίζει την επιλογή μεταξύ της αυτο-ανανέωσης και της διαφοροποίησης στα HSCs (Ito et al. 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι η PML φαίνεται αυξημένη σε αρκετές περιπτώσεις λευχαιμιών και πιο

συγκεκριμένα στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML). Μάλιστα, ασθενείς με CML και χαμηλή έκφραση PML είχαν συνολικά καλύτερη απόκριση στη θεραπεία, παρατήρηση που έρχεται σε αντίθεση με την ογκοκατασταλτική δράση της στους συμπαγείς όγκους. Η απαλοιφή της PML μείωσε τον πληθυσμό των κύτταρων που δημιουργούν τα λευχαιμικά κύτταρα (Leukemia initiating cells - LICs) επιβεβαιώνοντας τον ρόλο της στην συντήρηση των βλαστικών κυττάρων του αίματος, φυσιολογικών και καρκινικών (Ito et al. 2008).

Ο Ρόλος της PML στον καρκίνο

Η έκφραση της PML πρωτεΐνης συχνά χάνεται σε διάφορους καρκίνους όπως στον καρκίνο του προστάτη, του μαστού και του κεντρικού νευρικού συστήματος (Gurrieri et al. 2004). Η PML συμβάλλει στην ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας και της κυτταρικής γήρανσης στα καρκινικά κύτταρα, σταθεροποιώντας την πρωτεΐνη p53 (Ferbeyre et al. 2000; de Stanchina et al. 2004), απελευθερώνοντας ασβέστιο από το ενδοπλασματικό δίκτυο και ενεργοποιώντας την προ-αποπτωτική διαδικασία μέσω της δέσμευσης του DAXX (Missiroli et al. 2016; Zhong, Salomoni, and Pandolfi 2000). Η PML επάγεται επίσης από την ογκογόνο K-RAS και προωθεί την κυτταρική γήρανση (Scaglioni et al. 2012). Όπως προαναφέρθηκε, η PML ρυθμίζεται από τις κινάσες ATR/Chk2, που επάγονται από βλάβες στο DNA με σκοπό την ενεργοποίηση της απόπτωσης (Bernardi et al. 2004). Το PML μπορεί να καταστείλει την μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού και των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την αγγειογένεση (K-S Hsu et al. 2016; Kuo-Sheng Hsu et al. 2017; Reineke et al. 2008; Reineke, Liu, and Kao 2010; Scaglioni et al. 2012; Yamada et al. 2014).



Εικόνα 15 Σύνοψη της ογκοκατασταλτικής δράσης της PML και της προ-ογκογόνου δράση της (Martin-Martin, Sutherland, and Carracedo 2013).

Από την άλλη μεριά, η υψηλή έκφραση της PML έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε κάποιες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, όπου η PML βρέθηκε υπερεκφρασμένη σε βιοψίες ασθενών με TNBC. Σε έρευνα όπου μελετήθηκε η οξείδωση των λιπαρών οξέων (FAO) φάνηκε ότι η PML βελτιώνει το FAO μέσω του μονοπατιού PPAR και την απακετυλίωση του PPAR- coactivator 1a (PGC1a) από το SIRT1. Επιπλέον, η PML προάγει την παραγωγή ATP αναστέλλοντας την απόπτωση in vitro, ενώ το αποτέλεσμα αντιστράφηκε όταν έγινε φαρμακολογική αναστολή του FAO (Carracedo et al. 2012). Σε άλλη μελέτη της ίδιας ομάδας φάνηκε ότι η PML ρυθμίζει θετικά την έκφραση του γονιδίου SOX9 στα βλαστικά κύτταρα των TNBC, ενώ η PML ρυθμίζεται θετικά από την STAT3 (Martín-Martín et al. 2016). Ωστόσο, η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με την παρατήρηση που αφορά τη συμμετοχή της PML στην ανάπτυξη του μαστικού αδένα. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι η PML ρυθμίζεται αυστηρά από τις STATs κατά την ανάπτυξη του μαστού με υψηλά επίπεδα έκφρασης και μέγεθος των PML-NBs στους παρθένους ιστούς και χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας. Η έκφραση της PML είναι αντίθετη με την έκφραση των STAT5/STAT6/STAT3 υποδηλώνοντας ότι η PML ρυθμίζεται αρνητικά από τους συγκεκριμένους παράγοντες κατά την ανάπτυξη του μαστικού αδένα (Wenjing Li et al. 2009). Τέλος, πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι η PML είναι απαραίτητη για τη μεταστατική συμπεριφορά των TNBC κυττάρων ρυθμίζοντας μεταγραφικά γονίδια-στόχους του HIF1a (Ponente et al. 2017). Η υπερέκφραση της PMLIV στα MDAMB231 TNBC κύτταρα μπλόκαρε τον κυτταρικό κύκλο και ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με αντιστρεπτό ρόλο καταστέλλοντας τον FOXM1 και ρυθμίζει την λειτουργία της FOXO3 που σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση και την ανθεκτικότητα στο κυτταρικό στρες (Sachini et al. 2019). Ο διττός ρόλος της PML στον καρκίνο του μαστού υποδηλώνει την ανάγκη κάθε φορά για διερεύνηση, όχι μόνο του κυτταρικού υποτύπου, αλλά και του περιβάλλοντός του.

ΣΚΟΠΟΣ

Η μελέτη του καρκίνου του μαστού είναι ένα πεδίο συνεχούς εξέλιξης, λόγω των περίπλοκων γενετικών και επιγενετικών διεργασιών που τον διέπουν οι οποίες οδηγούν εξελικτικά σε υψηλότερη επιθετικότητα, αντίσταση στη θεραπεία και υποτροπή. Η ετερογένεια μέσα στους συμπαγείς όγκους και το περιβάλλον που δίνει στα κύτταρα το πλεονέκτημα της επιβίωσης, καθώς και ο οργανοτροπισμός που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα είναι απαραίτητες πτυχές της νόσου που πρέπει να διασαφηνιστούν για την επιτυχή διάγνωση, πρόγνωση και αντιμετώπιση της.

Η PML δρα τόσο ως ογκογόνος όσο και ως ογκοκαταστολέας σε διαφορετικά κυτταρικά και ζωικά μοντέλα μέσω των ποικίλων λειτουργιών και πρωτεινικών αλληλεπιδράσεων και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεωνη εντός των PML-NBs. Η φαρμακολογική στόχευση PML έχει ήδη αποδειχθεί σημαντική στη αντιμετώπιση της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (APL). Η κατανόηση των μηχανισμων που διέπουν τις αποκλίνουσες επιδράσεις της στο καρκίνο, αποτελεί ενδιαφέρον πεδίο μελέτης για μελλοντική φαρμακολογική στόχευση ή χρήση ως προγνωστικός δείκτης σε διαφορετικά νεοπλασματικά περιβάλλοντα.

Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να κατανοήσει τη λειτουργία της PML εντοπίζοντας άμεσους και έμμεσους στόχους και των μηχανισμών μέσω των οποίων ρυθμίζει τη βλαστικότητα και τη μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Παλαιότερα δείξαμε ότι υπερέκφραση της PMLIV στα TNBC κύτταρα ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στοχεύοντας κρίσιμους μεταραφικούς παράγοντες. Εδώ εξετάζουμε το πιθανό ρόλο της αποσιώπησης του γονιδίου της PML στη φυσιολογία και συμπεριφορά δύο διαφορετικών τύπων καρκινικών κυττάρων σε in vitro καλλιέργειες και in vivo ξενομοσχευμάτων σε ποντικούς πλήρως ανοσοκατεσταλμένους (NSG). Παρακολουθούμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μεταναστευτικότητα, τη βλαστικότητα και επιθηλιακούς /μεσεγχυματικούς δείκτες in vitro, καθώς επίσης και πρωτεινικές αλληλεπιδράσεις με τη πρωτεΐνη PML με πιθανή αιτιολογική σχέση με τις βιολογικές δράσεις της. In vivo παρακολουθούμε την τοπική ανάπτυξη του όγκου και των πιθανών λεμφαδενικών ή άλλων μακρινών μεταστάσεων. Μελετάμε και χαρακτηρίζουμε την αναδιαμόρφωση των μεταγραφικών πρότυπων των κυττάρων μετά από αποσιώπηση του γονιδίου PML . Σε συνδυσμό με βιοπληροφορική ανάλυση αναδεικνύουμε μηχανισμούς και γονιδιακούς στόχους που αιτιολογούν τη βιολογική δράση και αποτελούν τη βάση για περαιτέρω πειραματική διερέυνηση.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πλασμίδια

- Για τη δημιουργία σταθερών κλώνων shPML, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής short-hairpin RNA αλληλουχίες:
- Sh0: 5'-AGATGCAGCTGTATCCAAG-3' (Everett et al. 2006)
- Sh1: 5'-GCTGTATCCAAGAAAGCCA-3'

Οι οποίες κλωνοποιήθηκαν στον λεντιϊκό φορέα pLKO.1 (Addgene plasmid # 8453) υπό τον U6 υποκινητή μεταξύ των Agel and EcoRI περιοριστικών θέσεων. Οι κλώνοι επιλέχθηκαν με χρήση του αντιβιοτικού πουρομυκίνη που φέρει ο φορέας.

- Οι φορείς που έφεραν την PMLIV, την PMLIII και την PMLI έχουν περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη (Gialitakis et al. 2010). Για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και συνεντοπισμού οι PMLIV, PMLIII and PMLI κλωνοποιήθηκαν στον dsRED monomer φορέα (Clontech).
- Επίσης κλωνοποιήθηκαν τα TWIST1 σε GFP-C2 (Clontech) μεταξύ EcoRI και Sall.
- Με ανάλογο τρόπο κλωνοποιήθηκε και το TWIST2 μεταξύ HindIII και BamH1 στον GFP-C3 (Clontech).
- SNAIL1 (Addgene plasmid # 16225)
- mCherry LEGO-C2 (Addgene plasmid #27339)
- Το SLUG κλωνοποιήθηκε από τον pPGS-hSLUG (Addgene plasmid #25696) σε GFP-C3 με EcoRI άκρα
- P53-326_truncation κλωνοποιήθηκε από το P53_GFP με NhE και SSPI (στο 326 αμινοξύ της P53) στον GFP-C3 με NhE και SMAI
- Τα CMV P53_wild type-GFP, CMV P53-R175K-GFP, CMV P53-R273K-GFP και HIF1aGFP υπήρχαν στο εργαστήριο.

Διαμολύνσεις και παραγωγή λεντιϊών

Οι παροδικές διαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο καθίζησης του DNA με φωσφορικό ασβέστιο και με Lipofectamin 2000 (Thermo science) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι λεντιϊκοί φορείς δημιουργήθηκαν με διαμόλυνση HEK-293T κυττάρων με φωσφορικό ασβέστιο. Τα κύτταρα σε 60% ποσοστό κάλυψης της καλλιεργητικής επιφάνειας επιμολύνθηκαν με τους αντίστοιχους φορείς για το DNA ενδιαφέροντος (20μg για πιάτο 100 mm) και για τις πρωτεΐνες που «πακετάρονται» οι ιοί (12μg PsPAX₂ για πιάτο 100 mm) και (6μg PMD₂G για πιάτο 100 mm). Την επόμενη μέρα

αλλάζεται το θρεπτικό και 48-72 ώρες μετά την διαμόλυνση συλλέγεται το υπερκείμενο και φιλτράρεται από 0,45μm φίλτρο.

Κυτταρικές σειρές και δημιουργία σταθερών κλώνων

Κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού ανθρώπου χρησιμοποιήθηκαν: MDA-MB-231, T47D και MCF7 καθώς και HEK293T και Cos-7 (ATCC) καλλιεργήθηκαν σε DMEM, 10% FBS και γκενταμυκίνη 1%, σε 5% CO2 και στους 37°C. Για τη δημιουργία ογκοσφαιρών τα κύτταρα μελέτης καλλιεργήθηκαν σε DMEM-F12 1: 1 (Gibco) που περιείχε B27 (1:50), bFGF (20ng/ml), EGF (20ng/ml) και 0,2% μεθυλοκυτταρίνη, σε πιάτα πολύ χαμηλής προσκόλλησης (ultra-low attachment plates).

Εκχύλιση RNA και ποσοτική αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qRT-PCR)

Η εκχύλιση του ολικού RNA έγινε χρησιμοποιώντας TRIzol (Invitrogen) / Nucleozol (Macherey-Nagel). Στη συνέχεια, 2μg RNA χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών χρησιμοποιώντας το ένζυμο M-MuLV Reverse Transcriptase (Biolabs) μαζί με αναστολέα RNάσης (Biolabs) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η σχετική αφθονία κάθε γονιδιακού μετάγραφου μετρήθηκε με ποσοτικό PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας τη χρωστική SYBR Green I (Invitrogen). Η σχετική έκφραση mRNA υπολογίστηκε μετά την εξομάλυνση έναντι των επιπέδων της β-ακτίνης ή του GAPDH. Σετ εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για qPT-PCR παρατίθενται στο παράρτημα.

RNA αλληλούχιση

Το ολικό RNA απομονώθηκε από κύτταρα αναφοράς και PML KD PML χρησιμοποιώντας TRIzol (Invitrogen). Για τα MDAMB231 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλληλούχισης των 3'-UTR άκρων του mRNA για τη δημιουργία βιβλιοθηκών με το QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit for Ion Torrent-Cat#012. Και η αλληλούχιση έγινε με Ion S5, με Ion 540 Reagents. Για την πλήρη αλληλούχιση RNA των MCF7 κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για τις βιβλιοθήκες τα NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina-E7760 και NEBNext Poly(A)mRNA Magnetic Isolation Module-E7490. Η Αλληλούχιση έγινε στη NextSeq 500 Illumina με FlowCell High 1x75. HISAT2 version 2.1 (genome mapper)

Ανάλυση των λιστών με τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια

Η ανάλυση διαφορικής έκφρασης διενεργήθηκε με το metaseqR. Η εξαγωγή λιστών διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων, η σύγκριση μετάξυ πειραμάτων και η στατιστική επεξεργασία τους έγιναν με τη χρήση του υπολογιστικού περιβάλλοντος της R. Η λειτουργική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διαδικτυακό εργαλείο g:Profiler (Reimand et al. 2016)

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western-Blot Analysis-WB)

Χρησιμοποιήσαμε RIPA (25 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) ρυθμιστικό διάλυμα για την εκχύλιση του πρωτεϊνικού υλικού από τα κύτταρα μελέτης που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (Complete, Sigma), ενώ η ποσοτικοποίηση του εκχυλίσματος έγινε με τη δοκιμασία Bradford. Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωση, ενώ η εμφάνιση του πρωτεϊνικών σημάτων έγινε με ECL (Thermo Scientific). Τα πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα παρακάτω:

PML	sc-377340 Santa Cruz
β-ΑCTIN	sc-47778, Santa Cruz
GAPDH	sc-32233, Santa Cruz
p53	sc-6243,Santa Cruz
p21	sc-397, Santa Cruz
STAT3	sc-8019, Santa Cruz
p-STAT3	9145S, Cell signaling
VIMENTIN	5741S, Cell signaling,
E-CADHERIN	3195S, Cell signaling
GFP	sc-9996, Santa Cruz
ERa	M7047, DAKO

Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation-IP)

Διεξήχθη ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων από HEK293T κύτταρα, ύστερα από υπερέκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με σκοπό τη πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Αφού εκχυλίστηκε το πρωτεϊνικό υλικό με RIPA όπως περιγράφηκε παραπάνω, 200μg πρωτεϊνικού υλικού επωάστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα όλη τη νύχτα στους 4 ° C. Την επόμενη μέρα, 20μl σφαιριδίων πρωτεϊνης G (ABT) προστέθηκαν σε κάθε δείγμα, αφού πρώτα είχαν πλυθεί με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα IP (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl), και οι αντιδράσεις επωάστηκαν στους 4 ° C για 3 ώρες. Οι μη ειδικές πρωτεϊνες εκπλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα NETN (10 mM TrisHCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1 mM PMSF). Στα δείγματα προστέθηκε SDS ρυθμιστικό διάλυμα και επωάστηκαν για 5 λεπτά στους 90°C και στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με ανοσοαποτύπωση (Western-blot analysis). Πριν την επώαση των δειγμάτων με τα αντισώματα κρατήθηκε το 10% του υλικού ως δείγμα αναφοράς (INPUT) το οποίο τρέχει μαζί με το ανοσοκατακρημνισμένο υλικό στην ηλεκτροφόρηση.

FACs analysis

Για την μελέτη της έκφρασης των CD24 και CD44 επιφανειακών δεικτών πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής στο FACs calibour της εταιρείας Becton Dickinson (BD) συνδεδεμένων με FITC, PRE, Cy7 ή αλοφυκοκυανίνη. Τα κύτταρα αποκολλώνται με τρυψίνη –EDTA και μετα αφού μονποιηθούν επωάζονται με κατάλληλη συγκέντρωση αντισώματος σε PBS-2%FCS-0.1% NaN3, ενώ στη συνέχεια αναλύονται με κατάλληλες ρυθμίσεις στις αντίστοιχες περιοχές εκπομπής

Ανοσοχρώσεις και μικροσκοπία

Τα κύτταρα για ανοσοχρώση καλλιεργήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και μονιμοποιήθηκαν σε 4% PFA/1X PBS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, διαπερατοποιήθηκαν με 0,5% Triton X-100/1X PBS για 10 λεπτά και ξεπλύθηκαν επανειλημμένα με 1X PBS. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάστηκαν με 1% BSA/1X PBS για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάστηκαν με πρωτογενή αντισώματα όλη τη νύχτα/1 ώρα. Μετά τις εκπλύσεις με PBS, προστέθηκε δευτεροταγές αντίσωμα στα δείγματα για μία ώρα. Το δευτερογενές αντίσωμα εκπλύθηκε ξανά τρεις φορές με PBS και οι πυρήνες των κυττάρων στη συνέχεια χρωματίστηκαν με DAPI (Sigma) και τοποθετήθηκαν σε πλάκες μικροσκοπίου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με μικροσκόπιο Zeiss Axioscope 2 Plus εξοπλισμένο με σύστημα σάρωσης με λέιζερ Bio-Rad Radiance 2100 και λογισμικό απεικόνισης Lasersharp 2000 και με ανεστραμμένο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP8 και αναλύθηκαν με το Leica Application Suite (Las). Τέλος, η αυτοψία των μεταστάσεων στα πειραματόζωα έγινε με το στερεοσκόπιο Leica M205FA και το Las.

Ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης

Οι ιστοί που απομονώθηκαν από τα πειραματόζωα, μονιμοποιήθηκαν με φορμαλίνη 10% (sigma-aldrich) και παρέμειναν όλη τη νύχτα στους 4°C. Στη συνέχεια πλύθηκαν 3 φορές με στείρο PBS και τοποθετήθηκαν σε 70% στείρα αιθανόλη (analytical grade). Μετά τοποθετήθηκαν σε μηχάνημα διαδοχικής αφυδάτωσης και παραφινοποίησης και τέλος οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε παραφίνη για να κοπούν σε μικροτόμο και να βαφτούν με αιματοξυλίνη-εοσίνη, αλλά και με αντισώματα, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη (Drakos et al. 2007).

Δοκιμασία μετανάστευσης και διείσδυσης κυττάρων

Με σκοπό τη μελέτη της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων κύτταρα επωάστηκαν μέσα σε transwell της Millicell σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Η πορώδης μεμβράνη είχε διάμετρο 8μm και από κάτω υπήρχε πλήρες θρεπτικό υλικό ως χημειοτρακτικός παράγοντας. Την επόμενη μέρα, αφού απομακρυνθούν τα κύτταρα που έχουν απομείνει στην πάνω πλευρά του transwell, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με αιθανόλη 70%, βάφονται με crystal violet (Sigma Aldrich) και προσμετρώνται στο μικροσκόπιο. Το ποσοστό των κυττάρων που έχει περάσει μέσα από την μεμβράνη σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που στρώθηκαν επάνω στο transwell είναι ενδεικτικό της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων.

Με σκοπό τη μελέτη της διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων, κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε σφαίρες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν μέσα σε βαθμιδωτής πυκνότητας matrigel (γέλη με συστατικά της εξωκυττάριας ύλης) (BD Matrigel)με σκοπό τη μελέτη της διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων

Statistical analysis

Η στατιστική μελέτη έγινε με το το λογισμικό της Microsoft EXCEL, το XLSTAT και το Graphpad Prism.

In vivo πειράματα σε πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν τα NSG ποντίκια που είναι πλήρως ανοσοκατεσταλμένα. Στην περίπτωση των MCF7 κυττάρων προσθέταμε στο νερό των πειραματόζωων β-οιστραδιόλη (8μg/ml) για τη διέγερση του ER μονοπατιού με σκοπό τη δημιουργία του όγκου.

Έγκριση διενέργειας πειραμάτων σε ζώα

Τα ποντίκια NSG αγοράστηκαν από το Jackson Laboratory. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με την Εργαστηριακή Επιτροπή Φροντίδας και Ηθικής του IMBB. Η εργασία σε ζώα εγκρίθηκε από την Επιτροπή Θεσμικής Φροντίδας και Δεοντολογίας του IMBB.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η αποσιώπηση της PML πρωτεΐνης επηρεάζει τη κυτταρική μορφολογία και την ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 2 κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού, η τριπλά αρνητική κυτταρική σειρά (TNBC) MDA.MB.231, καθώς επίσης και η MCF7 σειρά η οποία είναι θετική για τον οιστρογονικό υποδοχέα (ER*/luminal A). Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της PML πρωτεΐνης στον καρκίνο του μαστού, δημιουργήθηκαν σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι στους οποίους έγινε αποσιώπηση του PML γονιδίου με χρήση μικρής αλληλουχίας RNA (short-hairpin RNA-shRNA). Η ένθεση του shRNA στα καρκινικά κύτταρα μαστού, έγινε μέσω διαμόλυνσης αυτών με λεντιϊκό φορέα που έφερε την επιθυμητή αλληλουχία αποσιώπησης, καθώς επίσης και αλληλουχία για το αντιβιοτικό πουρομυκίνη. Στη συνέχεια οι κλώνοι επιλέχθηκαν με βάση την ανθεκτικότητα τους στην πουρομυκίνη, ύστερα από την προσθήκη της στην καλλιέργεια τους. Η μειωμένη έκφραση του PML γονιδίου επιβεβαιώθηκε με πειράματα ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qRT-PCR), ενώ η μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση διαπιστώθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωσης τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (western-blot analysis)(εικόνα 2), Επιπλέον δεν ανιχνεύτηκαν τα χαρακτηριστικά πυρηνικά σωμάτια (PML-NBs) που δημιουργεί η PML πρωτεΐνη στους πυρήνες των κυττάρων (εικόνα 16).



Εικόνα 16 Πρωτεϊνική έκφραση για την PML πρωτεΐνη στις δύο κυτταρικές σειρές μελέτης (Α). Ύστερα από αποσιώπηση του PML γονιδίου με τη χρήση λεντιϊκού shRNA φορέα, επιλέχθηκαν οι κατάλληλοι κλώνοι στους οποίους είχε γίνει η αποδοτικότερη μείωση της έκφρασης της PML. Χρώση με ανοσοαποτύπωση των PML-NBs στον πυρήνα των MDA.MB.231 (κόκκινος φθορισμός) και MDA.MB.231 KD PML κυττάρων σε συνεστιακό μικροσκόπιο.DAPI χρώση (μπλε) των πυρήνων.

Παρατηρώντας τα κύτταρα σε φωτονικό μικροσκόπιο διαπιστώθηκε ότι άλλαξε η μορφολογία τους και πιο συγκεκριμένα φάνηκε πως χαλάρωσαν οι στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, ενώ ανέπτυξαν πιο ατρακτοειδές σχήμα (spindle-shaped) (εικόνα 17). Ειδικά στην περίπτωση των MDA.MB.231 κυττάρων KD PML, ενισχύθηκε ο φαινότυπος των μοναδιαίων κυττάρων με επιμηκυμένα άκρα, ενώ και τα MCF7 άρχισαν να αποκτούν περισσότερο «μεσεγχυματική» μορφή.





Εικόνα 17 Απεικόνιση από φωτονικό μικροσκόπιο των MDAMB231 KD PML & MCF7 KD PML συγκριτικά με τις ομάδες αναφοράς. Οι επιλεγμένοι κλώνοι MDA.MB.231 KD PML έχουν αποκτήσει πιο ατρακτοειδές σχήμα με πιο επιμηκυσμένα άκρα, ενώ τα MCF7 KD PML κύτταρα φαίνεται να έχουν πιο χαλαρές συνδέσεις αποκτώντας περισσότερο μεσεγχυματική μορφή.

Η αποσιώπηση της PML πρωτεΐνης, ενώ δεν επηρέασε ουσιαστικά την πολλαπλασιαστική ικανότητα των MDA.MB.231, συνέβαλλε στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των MCF7 κυττάρων με στατιστικά σημαντική διαφορά, παρατήρηση που ενισχύθηκε και από τη μειωμένη έκφραση της p21 πρωτεΐνης, η οποία είναι βασικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου(Karimian, Ahmadi, and Yousefi 2016; Rastogi and Mishra 2012)(εικόνα 18)



Εικόνα 18 Καμπύλη αύξησης των κυτταρικών πληθυσμών (Α). Η αποσιώπηση του PML γονιδίου, αν και δεν επηρεάζει ουσιαστικά τον πολλαπλασιασμό των MBA.MB.231 κυττάρων, στην περίπτωση των MCF7 υπήρξε αύξηση στατιστικά σημαντική στις μέρες 2,3,4. Παρατήρηση η οποία επιβεβαιώθηκε από τη μειωμένη έκφραση της p21 πρωτεΐνης στα MCF7 KD PML (B). *ttest p-value≤0.05*

Σε πειράματα επαγόμενης υπερέκφρασης του PMLIV σε MDA.MB.231 κύτταρα προέκυψε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς και της αυτοανανέωσης τους με αναστρέψιμο τρόπο. Η μεταγραφική αλληλούχιση των κυττάρων προσδιόρισε γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο(Sachini et al. 2019). Τα αποτελέσματα μας με ολική καταστολή της PML υποδηλώνει ότι διαφορετικές ισομορφές έχουν διακριτό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η αποσιώπηση της PML επηρεάζει τα μεταγραφικά πρότυπα των MDAMB231 & MFC7 κύτταρων

Θέλοντας να διερευνηθεί περαιτέρω η απορρύθμιση στη γονιδιακή έκφραση που ενδεχομένως προκαλεί η απώλεια της PML, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση επόμενης γενιάς των 3'UTR άκρων των MDAMB231 & MDAMB231 KD PML, και διαπιστώθηκε πως υπήρξαν αρκετά απορρυθμισμένα γονίδια (Differential expressed genes/DEGs). Πιο συγκεκριμένα μετά την αποσιώπηση του PML γονιδίου υπήρξαν 1025 απορρυθμισμένα γονίδια με στατιστικά σημαντική διαφορά (εικόνα 19)





Εικόνα 19 Διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια στα MDA.MB.231 KD PML, συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς με *p-value≤ 0.05, και log2(FC) > 1*

κύκλο και την κυτταρική διαίρεση (εικόνα 20). Τα άλλα 517 που είχαν μειωμένη έκφραση, σχετίζονται με ποικίλες κυτταρικές διεργασίες. Πιο εμπλουτισμένη εξ αυτών ήταν η κυτταρική προσκόλληση των κυττάρων και η ρύθμιση μικρών RNA (miRNA), αλλά και ένα μονοπάτι σχετικό με την ΕΜΤ διαδικασία. (εικόνα 21).



Εικόνα 20 Γράφημα με τις κυτταρικές διεργασίες που επηρεάστηκαν περισσότερο στα MDA.MB231 KD PML συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς με *p-value≤ 0.05* για τα γονίδια τα οποία αυξήθηκε η έκφραση τους (A). Η πλειονότητα των Gene Ontologies GOs αφορά τον κυτταρικό κύκλο και τη κυτταρική διαίρεση. Γονίδια που εξετάσθηκαν σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική επιβίωση αναφορικά με τα DEGs που ήταν αυξημένα (B). Ενδεικτικά απεικονίζονται κάποια GOs σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική διαίρεση (C).



Εικόνα 21 Γράφημα με τις κυτταρικές διεργασίες που επηρεάστηκαν περισσότερο στα MDA.MB231 KD PML συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς με *p-value≤ 0.05* για τα γονίδια τα οποία μειώθηκε η έκφραση τους. Οι κορυφαίες Gene Ontologies GOs αφορούν την κυτταρική προσκόλληση και τη ρύθμιση μικρών RNAs (A). Γονίδια που ελέγχθηκε η έκφραση τους αναφορικά με τα DEGs που είχαν μειωμένη έκφραση (B). Ενδεικτικά απεικονίζονται κάποια GOs σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική διαίρεση (C).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πλήρης αλληλούχιση του RNA των MCF7 & MCF7 KD PML. Υπήρξαν 1893 DEGs από τα οποία 1275 είχαν μειωμένη έκφραση και 618 αυξημένη έκφραση. Αναφορικά με τις κυτταρικές λειτουργίες, μόνο δύο μονοπάτια φαίνεται πως επηρεάζονται από τα μειωμένα γονίδια, ενώ τα γονίδια που είναι αυξημένη η έκφραση τους, σχετίζονται με κυτταρικές λειτουργίες που αφορούν την κυτταρική προσκόλληση και συνδέσεις με υποστρώματα (εικόνα 22).



Εικόνα 22 Γράφημα με τις κυτταρικές διεργασίες που επηρεάστηκαν περισσότερο στα MCF7 KD PML συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς με *p-value≤ 0.05.* Οι κορυφαίες Gene Ontologies GOs αφορούν το μονοπάτι του Tumor Necrosis Factor –a (TNFa) (Α) και την κυτταρική προσκόλληση (Β). Γονίδια που ελέγχθηκε η έκφραση τους αναφορικά με τα DEGs (C).

Όταν συγκρίθηκαν οι δύο κυτταρικοί τύποι μεταξύ τους, μικρή συσχέτιση υπήρξε μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα ανάμεσα στα DEGs, μόλις 8 γονίδια στα MDAMB231 KD PML & MCF7 KD PML είχαν αυξημένη έκφραση σε σχέση τις ομάδες αναφοράς και σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, ενώ 20 γονίδια είχαν μειωμένη έκφραση και σχετίζονται με το NF-kB μονοπάτι (η λίστα με τα γονίδια από την εκάστοτε σύγκριση παρατίθενται στο παράρτημα) (πίνακας 6).

Πίνακας 6 Λειτουργική ανάλυση από τα κοινώς εκφραζόμενα γονίδια στα MDAMB231 & MCF7

Functional Enrichment in commonly regulated gene	es in MDA.MB.231 and N	MCF7		
DESCRIPTION	term_id	-log10(p-value)		
G1/S-Specific Transcription	REAC:R-HSA-69205	2.198542		
Acute myeloid leukemia	KEGG:05221	1.665791		
8 common genes in MDAMB231 and MCF7 OVERex	pressed			
NF-kappa B signaling pathway	KEGG:04064	1.875732		
20 common genes in MDAMB231 and MCE7 UNDERexpressed				

Από την άλλη μεριά όταν συγκρίθηκαν γονίδια που ήταν αντίθετα ρυθμιζόμενα ανάμεσα τις δύο κυτταρικούς τύπους, αναφορικά με τις κυτταρικές λειτουργίες, φάνηκε πως σχετίζονται με την p53 πρωτεΐνη και με τη νευρική διαφοροποίηση (πίνακας 7)

Πίνακας 7 Λειτουργική ανάλυση από τα κοινώς εκφραζόμενα γονίδια στα MDAMB231 & MCF7

OVEREXPRESSED genes in MCF7 and MCe versa		
DESCRIPTION	term_id	-log10(p-value)
Factor: p53; motif: RGRCWWGYCYNGRCWWGYYY; match	1	
class: 1	TF:M01652_1	2.729908
Factor: HIC1; motif: NSNNNNTGCCCSSNN	TF:M01072	2.320464
filopodium	GO:0030175	1.393625
23 common genes in MDAMB231 OVERexpressed and Mo	CF7 UNDERexpre	essed
DESCRIPTION	term_id	-log10(p-value)
Ectoderm Differentiation	WP:WP2858	1.949997

Functional Enrichment between UNDEREXPRESSED genes in MDA.MB.231 and OVEREXPRESSED genes in MCF7 and vice versa

8 common genes in MDAMB231 UNDERexpressed and MCF7 OVERexpressed

Η PML πρωτεΐνη συμβάλλει στη διατήρηση των επιθηλιακών χαρακτηριστικών των κυττάρων, ιδιαίτερα στα MDA.MB.231.

Σύμφωνα με τη μελέτη της Χατζημιχαήλ και των συνεργατών της, η PML πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του πληθυσμού των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων του ποντικού (mESCs). Τα mESCs είναι επιθηλιακά κύτταρα και μετά την αποσιώπηση του γονιδίου της PML, αποκτούσαν πιο μεσεγχυματική μορφολογία και οδηγούνταν σε διαφοροποίηση. Επίσης εμβρυικοί ινοβλάστες (MEFs) PML^{-/-} δε μπορούσαν να πραγματοποιήσουν την μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση (MET), η οποία ήταν απαραίτητη για τον επιτυχή επαναπρογραμματισμό τους σε επαγόμενα πλειοδύναμα κύτταρα (iPSCs). Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση της επιθηλιακής (Vimentin-VIM) (Hadjimichael et al. 2017).

Τα MDA.MB.231, τα οποία αν και έχουν προέλευση το επιθήλιο του μαστού, έχουν μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά, έχουν υψηλότερη έκφραση της PML πρωτεΐνης σε σχέση με τα MCF7. Αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης CDH1 είναι αρκετά χαμηλά σε σχέση με τα περισσότερο επιθηλιακά MCF7. Εντούτοις, παρατηρήθηκε μείωση της CDH1 και στις δύο περιπτώσεις, ενώ διαπιστώθηκε μικρή αύξηση της βιμεντίνης. Μείωση υπήρξε και στον επιθηλιακό επιφανειακό δείκτη CD24, μετά την αποσιώπηση της PML και στις δύο ομάδες μελέτης (εικόνα 23).



Εικόνα 23 qRT-PCR ανάλυση για τα γονίδια PML, CDH1(επιθηλιακή καντχερίνη 1) και CD24 (επιφανειακός δείκτης που εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα) (Α). Western-blot ανάλυση για τις πρωτεΐνες βιμεντίνη (VIMENTIN/μεσεγχυματικός δείκτης), CDH1, ERa (υποδοχέας α για τα οιστρογόνα).

Η μείωση του CD24 επιβεβαιώθηκε και σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής με πιο έντονη τη μείωση στα MDA.MB.231 όταν αυτά καλλιεργούνται σε 2D καλλιέργειες. Εν αντιθέσει η έκφραση του επιφανειακού δείκτη CD44, δεν άλλαξε σημαντικά (εικόνα 24) Ο συνδυασμός της έκφρασης CD44⁺/CD24⁺ χαρακτηρίζει τα βλαστικά καρκινικά κύτταρα(Al-Hajj et al. 2003) και η διαφοροποίηση στην έκφραση τους, οδηγώντας στον CD44⁺/CD24^{low} φαινότυπο, ευνοεί τη μεταστατικότητα των κυττάρων.



Εικόνα 24 Κυτταρομετρία ροής όπου εξετάστηκαν οι επιφανειακοί δείκτες CD44 και CD24 στα κύτταρα μελέτης που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες ογκοσφαιρών (oncospheres) και σε συνθήκες μονοστιβάδας(2D monolayers).

Πράγματι σε *in vitro* transwell δοκιμασίες, όπου εξετάσθηκε η ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν, φάνηκε πως η έλλειψη της PML οδήγησε στην αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων τόσο για τα MDA.MB.231, όσο και για τα MCF7 (εικόνα 25).



Εικόνα 25 Δοκιμασία μετανάστευσης σε transwell (8μm). Και στις δύο ομάδες μελέτης υπήρξε αύξηση του ποσοστού κυττάρων που διέσχισε την πορώδη μεμβράνη με στατιστικά σημαντική διαφορά. *ttest p-value≤0.05*

Στην περίπτωση των MDA.MB.231 η ενίσχυση της μεταναστευτικότητας παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της 3D *in vitro* δοκιμασίας, όπου τα κύτταρα αφού καλλιεργηθούν σε συνθήκες σφαιρών, στη συνέχεια τοποθετούνται σε matrigel και παρακολουθείται η «δραπέτευση» των κυττάρων από τις σφαίρες (Oraiopoulou et al. 2018). Στο σύνολο τους τα KD PML κύτταρα είχαν μετακινηθεί περισσότερο από τη σφαίρα, υποδηλώνοντας και αυξημένη ικανότητα διείσδυσης (εικόνα 26).



Εικόνα 26 Δοκιμασία καλλιέργειας των MDAMD231 & MDAMB231 KD PML κυττάρων σε σφαίρες και στη συνέχεια καλλιέργεια των σφαιρών σε βαθμιδωτής πυκνότητας (A). Western blot ανάλυση για τις πρωτεΐνες CDH1, VIMENTIN, pSTAT3 και ολικής STAT3 (B)

Την ενίσχυση της μεταναστευτικής ικανότητας επιβεβαίωσαν και οι western blot αναλύσεις στις οποίες παρατηρήθηκε η αυξημένη φωσφορυλίωση της STAT3 πρωτεΐνης, η οποία σχετίζεται με την μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων(Thakur et al. 2015; Xie, Li, and Zhang 2018)

Η PML πρωτεΐνη επιδρά διαφορετικά στην ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν σφαίρες *in vitro* & *in vivo*.

Τα luminal A - MCF7 κύτταρα σε συνθήκες καλλιέργειας σφαιρών είναι γνωστό ότι σχηματίζουν στρογγυλές σφαίρες. Τα claudin-low MDA.MB.231, από την άλλη μεριά, σχηματίζουν συσσωματώματα, ή αλλιώς σφαίρες σαν σταφύλι στη δομή (grape-like morphology)(Borgna et al. 2012). Παρατηρήσεις οι οποίες επιβεβαιώθηκαν και στα πειράματα αυτής της εργασίας, όπου τα MDA.MB.231 σχημάτισαν συμπαγείς σφαίρες χαρακτηριστικές grape-like, ενώ τα MCF7 σχημάτισαν περισσότερο στρογγυλές σφαίρες, με μορφολογία «κούφια» στο εσωτερικό τους . Στους KD PML κλώνους διαπιστώθηκε πως στα MCF7 κύτταρα η μορφολογία των σφαιρών άλλαξε, προσομοιάζοντας αυτήν των MDA.MB.231 (εικόνα 27). Αντίθετα στα MDA.MB.231 αν και δεν άλλαξε ουσιαστικά η μορφολογία, αξιοσημείωτη ήταν η μείωση της του αριθμού των σφαιρών που σχημάτιζαν (εικόνα 27).





Εικόνα 27 Μορφολογία ογκοσφαιρών που σχημάτισαν τα MCF7 και MDA.MB.231 (Α). Ποσοστό των κύτταρων που σχημάτισαν σφαίρες (Β). *ttest p-value≤ 0.05

Με σκοπό να παρατηρηθεί η συμπεριφορά των κυττάρων in vivo, ύστερα από την αποσιώπηση του PML γονιδίου, οι κυτταρικές σειρές μελέτης διαμολύνθηκαν με λεντιϊκό φορέα, ο οποίος έφερε αλληλουχία για την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry. Κύτταρα από τις δύο ομάδες μελέτης ενέθηκαν υποδόρια σε πλήρως ανοσοκατεσταλμένους μύες (NSG mice). Καταγράφοντας μετρήσεις των πρωτογενών όγκων ανά τέσσερις μέρες διαπιστώθηκε ότι, ενώ στα MCF7 κύτταρα δεν υπήρχαν ουσιαστικές διαφορές στους όγκους ανάμεσα στις δύο ομάδες, KD PML και ομάδα αναφοράς (εικόνα 29), στα MDA.MB.231 KD PML ομάδα ανέπτυξε μεγαλύτερους όγκους στα πειραματόζωα (εικόνα 28). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με την in vitro δοκιμασία σφαιρών που προηγήθηκε. Το μικροπεριβάλλον, όμως, και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες δημιουργούνται οι όγκοι,, διαφέρει ανάμεσα στις in vitro και in vivo δοκιμασίες. Οι υποξικές συνθήκες μέσα στον όγκο στο σώμα του πειραματόζωου, σε αντίθεση με τις νορμοξικές υπό τις οποίες καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα, ώστε να κάνουν σφαίρες, είναι από

τους παράγοντες που ενδεχομένως διαφοροποιούν το αποτέλεσμα. Επίσης η αλληλεπίδραση με άλλους τύπους κυττάρων, π.χ. ενδοθηλιακά ή λιποκύτταρα, κυτοκίνες και κύτταρα του ανοσοποιητικού συμβάλλουν στη διαφοροποίηση του καρκινικού φαινοτύπου (Zhou et al. 2019). Κύτταρα που απομονώθηκαν από τους πρωτογενείς όγκους (P0) και καλλιεργήθηκαν εκ νέου προς σχηματισμό σφαιρών, διαπιστώθηκε ότι είχαν σχεδόν 2 φορές μεγαλύτερο αριθμό σφαιρών στα KD PML κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση του μικροπεριβάλλοντος αναφορικά με τον φαινότυπο των κυττάρων (data not shown).







Εικόνα 28 Καμπύλη ανάπτυξης όγκων MDAMB231 control (κόκκινο) & KD PML (μωβ) (Α). Πρωτογενείς όγκοι των MDAMB231 control και MDAMB231 KD PML. Η παρατήρηση έγινε σε στερεοσκόπιο φθορισμού. (Β) *ttest p-value ≤ 0.05



Εικόνα 29 Καμπύλη ανάπτυξης όγκων MCF7 control (κόκκινο) & KD PML (μωβ) (Α). Πρωτογενείς όγκοι των MCF7 control και MCF7 KD PML. Η παρατήρηση έγινε σε στερεοσκόπιο φθορισμού. (Β)

Η PML πιθανά συμμετέχει στη ρύθμιση της καρκινικής αγγειογένεσης στις υποξικές συνθήκες του πρωτογενούς όγκου, εν μέρει αλληλεπιδρώντας με την HIF1a

Από την ιστολογική ανάλυση που διενεργήθηκε, παρατηρήθηκε μειωμένη νέκρωση στους πρωτογενείς όγκους των KD PML κυττάρων (εικόνα 30 A,B). Σε προηγούμενη μελέτη ενέθηκαν σε ποντίκια εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού (MEF's) που ήταν pml^{-/-} και ανέπτυξαν όγκους με περισσότερη αγγείωση, σε σχέση με τους ινοβλάστες αναφοράς(Bernardi et al. 2006). Θέλοντας να διερευνήσουμε τη σχέση της PML με τον HIF1a υπερεκφράσαμε την PMLIV πρωτεΐνη και τον HIF1a σε HEK293T κύτταρα. Οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στους πυρήνες των κυττάρων και όταν έγινε ανοσοκατακρήμνιση της PML πρωτεΐνης διαπιστώσαμε ότι αλληλεπιδρούσαν (εικόνα 30 D). Μεταγραφικά δεν άλλαξε σημαντικά η έκφραση του HIF1a γονιδίου, εν αντιθέσει με τους στόχους της HIF1a πρωτεΐνης VEGFa και PGK1 των οποίων η έκφραση αυξήθηκε σημαντικά στους πρωτογενείς όγκους (εικόνα 30 E)



Εικόνα 30 Χρώση αιματοξυλίνης εοσίνης σε μεγεθύνσεις 100x και 400x για τους πρωτογενείς όγκους από MDAMB231 control & KD PML (A). Ιστολογική ανάλυση των πρωτογενών όγκων στις MDA.MB.231 control και KD PML ομάδες χ^2 test p-value ≤ 0.05(B). Γονιδιακή έκφραση (mRNA), με qRT-PCR, ανάλυση του HIF1a στην κυτταρική σειρά και στους πρωτογενείς όγκους συγκριτικά με τις KD PML ομάδες(C). Πείραμα συνεντοπισμού της PMLIV και τους HIF1a σε συνεστιακό μικροσκόπιο, όπου DAPI(μπλε) χρώση πυρήνων, PMLIV (κόκκινο), HIF1a (πράσινο)) και ανοσοκατακρήμνισης της PML πρωτεΐνης σε HEK293T κύτταρα στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση της PMLIV πρωτεΐνης και του HIF1a παράγοντα και western blot ανάλυση για το GFP που ήταν επισημασμένο ο HIF1a. Η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο. (D). Γονιδιακή έκφραση (mRNA) του VEGFa και PGK1 στις κυτταρικές σειρές που απομονώθηκαν από τους πρωτογενείς όγκους xenograft primary tumor cell lines) και από τους πρωτογενείς όγκους (xenograft primary tumors) από τους όποιους εκχυλίστηκε κατευθείαν RNA υλικό. Κάθε ομάδα από τις κυτταρικές σειρές του όγκου και από τον όγκο συγκρίθηκαν με την αντίστοιχη μητρική σειρά control & KD PML(E).

Στους συμπαγείς όγκους το μικροπεριβάλλον είναι υποξικό και αυτή η συνθήκη σταθεροποιεί τον HIF1a και HIF2a, που συνήθως αποικοδομούνται σε νορμοξικές συνθήκες. Το mRNA μάλιστα του HIF1a μειώνεται στην υποξία καθώς η πρωτεΐνη σταθεροποιείται (Pawlus, Wang, and Hu 2014). Στη δική μας περίπτωση, απουσία PML, έχουμε αυξημένη έκφραση των γονιδίων στόχων που σχετίζονται με την αγγείωση του όγκου, υποδηλώνοντας είτε αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης HIF1a, είτε αυξημένη ενεργότητα της, συνεπώς η αλληλεπίδραση της με τη PML πιθανώς να την καταστέλλει.

Η αποσιώπηση της PML πρωτεΐνης συμβάλλει στην ενίσχυση της μεταστατικότητας των MDA.MB.231 κυττάρων *in vivo*.

Όταν οι όγκοι από τα MDA.MB.231 κύτταρα έφτασαν το ένα κυβικό εκατοστό, εν προκειμένω στην KD PML ομάδα, τα ζώα θυσιάστηκαν και έγινε στεροσκοπική παρατήρηση των πιθανών μεταστατικών εστιών με τη βοήθεια της κόκκινης φθορίζουσας χρωστικής πού έφεραν τα κύτταρα. Συγκρίνοντας την MDA.MB.231 ομάδα αναφοράς και την MDA.MB.231 KD PML, παρατηρήθηκαν αυξημένες μεταστάσεις στην KD PML ομάδα. Πιο συγκεκριμένα όλα τα πειραματόζωα (7/7) εμφάνισαν εκτενείς μεταστατικές εστίες στους πνεύμονες, σχεδόν όλα (6/7) ήταν θετικά για μεταστάσεις στο ήπαρ, τέσσερα εμφάνισαν μεταστάσεις στους μασχαλιαίους αδένες (4/7) (εικόνα 13) και ένα (1/7) εμφάνισε μετάσταση στον μυελό των οστών (πινάκας 8). Από την ιστολογική ανάλυση που έγινε επιβεβαιώθηκαν οι μεταστάσεις στο ήπαρ και οι εκτενείς μεταστάσεις στους πνεύμονες (εικόνα 31).

Πίνακας 8 Συγκεντρωτικός πίνακας μεταστάσεων που εμφάνισαν τα πειραματόζωα με τα MDA.MB.231 & MDA.MB.231 KD PML κύτταρα. Οι σταυροί αντιπροσωπεύουν την έκταση των μεταστάσεων +: θετικό / ++: αρκετές / +++: εκτενείς

Organ Metastatic Intensity (Autopsy and Stereoscopic Fluorescence Observation)						
Cell type		MDA.MB.231				
		control KD PML				
Lung	2/6	+	7/7	+++		
Liver	0/6		6/7	++		
Axillary LN	1/6	+	4/7	++		
Femoral						
Bone	0/6		1/7	+		



Εικόνα 31 Μεταστάσεις στον πνεύμονα, στο ήπαρ και στους μασχαλιαίους αδένες, στα MDAMB231 (A) & MDAMB231 KD PML. Η παρατήρηση έγινε σε στερεοσκόπιο φθορισμού (B). Ιστολογική ανάλυση των μεταστάσεων που εντοπίστηκαν στις πειραματικές ομάδες. Χρώση αιματοξυλίνης εοσίνης σε μεγεθύνσεις 100x και 400x (C). χ^2 test p-value ≤ 0.05 . Μεταστάσεις στους μασχαλιαίους αδένες. Η παρατήρηση έγινε σε στερεοσκόπιο φθορισμού (D) χ^2 test p-value ≤ 0.05

Κύτταρα απομονώθηκαν από τις μεταστατικές εστίες των πειραματόζωων και διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια για περαιτέρω διερεύνηση.

	Cells isolated from metastatic loci and cultured monolayer					
		m				
	MDA.MB.2	ouse				
31		id#	Metastatic locus			
	Control	#1	Primary			
		#3	Primary, Lung			
		#5	Primary, Blood			
		#6	Primary			
	KD PML	#1	Primary, Blood			
		#4	Primary, Blood, Bone Marrow			
		#5	Primary, Axillary Lymph Node, Blood,Lung			
		#7	Lung			

Τα κύτταρα και στους πρωτογενείς όγκους και στις μεταστάσεις, διατήρησαν την μειωμένη έκφραση του PML γονιδίου και της πρωτεΐνης, ενώ ενισχύθηκαν δείκτες που σχετίζονται με τη βλαστικότητα και τη μεταστατικότητα των κυττάρων, όπως η EpCAM και η ιντεγκρίνη CD49f (ITGA6). Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση των δειγμάτων αναφοράς η έκφραση της PML πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε για τους πρωτογενείς όγκους, τους πνεύμονες και το ήπαρ, για τα δείγματα που είχαν έστω και λίγες μεταστάσεις. Ως αρνητικό εκχύλισμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνικό υλικό από κυτταρική σειρά εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ποντικού (CGR8/mESCs) στο οποίο δεν ανιχνεύτηκε η PML πρωτεΐνη με το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε. Αντίστοιχα στην περίπτωση των KD PML, αν και υπήρχε υλικό και στους πρωτογενείς όγκους και στις μεταστάσεις, η PML πρωτεΐνη απουσίαζε (εικόνα 32).





Από την άλλη μεριά τα MCF7 κύτταρα δεν εμφάνισαν ιδιαίτερες μεταστάσεις και δεν υπήρξαν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ control και KD PML ομάδων. Η έκφραση της PML παρέμεινε και σε αυτήν την ομάδα σε χαμηλά επίπεδα στους όγκους (εικόνα 33).

Α								6	
DNG	Control #1	Control #2		Control	#3	Control #4	Control #5	Control #6	Control #7
Г									
	KD PML #1	KD PML #2		KD PML #3	3	KD PML #4	KD PML #5	KD PML #6	KD PML #7
IUNG									
D	Red Fluorescence				_	1			
D	Organ Metast	atic Inten	sity .	-1					ł
	(Autopsy and	a Stereos	copic	Fluores	cence	C	Primary tum	ontro Dontr	
	Coll trues	-		657	_	-	Control K		
	Centype		IVI				#7 #7	#7 MG	
	lung		roi		VIL			1 100 MT 1	8
	Lung	///	++	_ ///	+			Contraction of the local division of the loc	
	Liver	1/7	+	2/7	+			64	•
	Axillary LN	0/7		1/7	+				
	Femoral Bone	0/7		0/7					

Εικόνα 33 Πνεύμονες από τις δύο ομάδες μελέτης MCF7 & MCF7 KD PML. Η παρατήρηση έγινε σε στερεοσκόπιο φθορισμού. (Α). Συγκεντρωτικός πίνακας με τις μεταστάσεις που εμφάνισαν τα πειραματόζωα στις ομάδες μελέτης (Β). Έκφραση της PML πρωτεΐνης ενδεικτικά από τα ζώα που απομονώθηκε πρωτεΐνικό υλικό από τους πρωτογενείς όγκους (C).

Κύτταρα απομονώθηκαν από τους πρωτογενείς όγκους σε κυτταροκαλλιέργειες για

περαιτέρω	διερεύνηση,	ενώ δεν	κατέστη	δυνατή η	απομόνωση	από	μεταστατικές	εστίες

Cell isolate	Cell isolated from metastatic loci and cultured monolayer					
MCF7	mouse id#	Metastatic locus				
Control	#1	Primary				
	#2	Primary				
	#3	Primary				
KD PML	#1	Primary				
	#2	Primary				

Οι δύο κυτταρικές σειρές μελέτης προέρχονται από διαφορετικούς υπότυπους καρκίνου του μαστού και μάλιστα έχουν πολύ μικρό ποσοστό επικάλυψης σημειακών σωματικών μεταλλαγών, μόλις 2% (cBioportal database) (Prat and Perou 2011) (εικόνα 36). Ενδεικτικά η πιο συχνά εμφανιζόμενη μετάλλαξη στους TNBC καρκίνους είναι η TP53 (53%), ενώ για τους
ER+ είναι η PIK3CA (39%) (COSMIC database). Εν προκειμένω τα MDA.MB.231 κύτταρα έχουν μεταλλαγμένη την TP53 πρωτεΐνη, ενώ τα MCF7 έχουν μεταλλαγμένη την PIK3CA.

Το μικρό ποσοστό επικάλυψης μεταλλαγών μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων ενδεχομένως είναι μία από τις πιθανές εξηγήσεις σε σχέση με τη διαφορά στο φαινότυπο *in vivo* μετά την αποσιώπηση της PML.

MDA.MB.231 cell line		MCF7 cell line		
	Percentage of mutation		Percentage of mutation	
Gene name	appearance	Gene name	appearance	
TP53	53%	РІКЗСА	39%	
TTN	21%	FYN	30%	
FMN2	8%	TENM1	18%	
PCDH15	8%	GATA3	13%	
NEB	7%	MDN1	9%	
FAT3	7%	PLXNA4	9%	
CSMD1	6%	ТҮК2	9%	
PCDHGA4	6%	RELN	8%	
MUC16	6%	SMARCC1	8%	
ADAMTS12	5%	WDFY4	8%	
PIEZO2	5%	ESR1	8%	



Εικόνα 34 Στον πίνακα απεικονίζονται οι σωματικές μεταλλάξεις που φέρουν οι δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας εργασίας, MDA.MB.231 και MCF7, σύμφωνα με το cBioportal για τις σωματικές μεταλλάξεις και την COSMIC βάση δεδομένων για τη συχνότητα εμφάνισης στους TNBC και ER+ υπότυπους αντίστοιχα του καρκίνου του μαστού των δειγμάτων που έχουν ελεγχθεί. Στο διάγραμμα δεξιά απεικονίζονται ο αριθμός των μεταλλάξεων στις δύο κυτταρικές σειρές και ο αριθμός των κοινών μεταλλάξεων.

Η απώλεια της PML συμβάλλει στην ανάπτυξη κυρίως πνευμονικών μεταστάσεων στα MDA.MB.231

Από τις παρατηρήσεις των μεταστάσεων που ανέπτυξαν τα ζώα διαπιστώθηκε ότι τα TNBC KD PML εμφάνισαν γρηγορότερα, κυρίως, πνευμονικές μεταστάσεις (εικόνα 37).



Εικόνα 35 Το σύνολο των εστιών που μετρήθηκαν ανά πνεύμονα σύμφωνα με το φθορισμό που εμφάνισαν (Α). Χρώση για κυτοκερατίνη, επιθηλιακή καντχερίνη 1, βιμεντίνη, p53 και Ki67 σε δείγματα πνευμονικών μεταστάσεων (Β).

Φαινότυπος ο οποίος διατηρήθηκε και σε επόμενο πέρασμα (P1) σε ποντίκια των κυττάρων που απομονώθηκαν από τις μεταστάσεις των ζώων (εικόνα 38).



Εικόνα 36 κλαδόγραμμα στο οποίο απεικονίζονται οι απομονωθείσες κυτταρικές σειρές, από τις οποίες κάποιες ενέθηκαν ξανά σε πειραματόζωα.

Τα κύτταρα αναφοράς (control) από το P1 δεν ανέπτυξαν έντονες πνευμονικές μεταστάσεις όταν ενέθηκαν ξανά στα ζώα. Αντίθετα η KD PML ομάδα (P1) διατήρησε τον φαινότυπο που είχαν εμφανίσει τα κύτταρα στα πρώτα πειραματόζωα (εικόνα 36). Απουσία PML φάνηκε πως τα κύτταρα απέκτησαν μια «επιλογή» μεταστατικότητας προς τον πνεύμονα. Θελήσαμε να δούμε πως σχετίζεται αυτό με γονίδια, τα οποία εντάσσονται, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Minn et al. 2005), σε μια ομάδα με υψηλή έκφραση σε πνευμονικές μεταστάσεις.



Εικόνα 37 Πνευμονικές μεταστάσεις από κύτταρα (P1) που είχαν απομονωθεί από πνευμονικές μεταστάσεις και ενέθηκαν ξανά υποδόρια σε πειραματόζωα. Τα KD PML κύτταρα διατήρησαν τον φαινότυπο της μετάστασης στους πνεύμονες. Η παρατήρηση έγινε σε στερεοσκόπιο φθορισμού.

Συγκρίνοντας τα DEGs από τα MDAMB231 με τη πνευμονική γονιδιακή υπογραφή υπήρξαν 15 κοινά γονίδια και η λειτουργική ανάλυση έδειξε συσχέτιση με μονοπάτια όπως το TGF-β σχετικό με την επιθηλιομεσεγχυματική διαδικασία.



Description	term_id	adj. p-value	-log10(adj.p-value)	genes
TGF-B Signaling in Thyroid Cells for Epithelial-Mesenchymal Transition	WP:WP3859	0.016826698	1.774001096	ID1,TNC
Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	REAC:R-HSA-6785807	0.030920597	1.509752133	FSCN1,PTGS2,MMP1
Relationship between inflammation, COX-2 and EGFR	WP:WP4483	0.032848034	1.483490621	PTGS2, MMP1
Unfolded protein response	WP:WP4925	0.032848034	1.483490621	MBTPS2,CASP1
PTGS2 homodimer complex	CORUM:1439	0.049988803	1.301127267	PTGS2

Στη συνέχεια κάναμε πειράματα qRT-PCR σε κύτταρα που απομονώθηκαν από όγκους των πειρατοζώων και από πνευμονικές μεταστάσεις. Τα γονίδια που μελετήθηκαν εμφάνισαν ενισχυμένη έκφραση σε σχέση με την κυτταρική σειρά (εικόνα 37). Αν και η σύγκριση μεταξύ της ομάδας shPML με την ομάδα αναφοράς στην κυτταρική σειρά, έδειξε πως υπήρξε μείωση παραγόντων που σχετίζονται με την μετάσταση στον πνεύμονα, όταν έγινε σύγκριση της εκάστοτε ομάδας μεταξύ κυτταρικής σειράς (cell line) και πρωτογενών όγκων (primary) καθώς και πνευμονικών μεταστάσεων (lung), παρατηρήθηκε ενισχυμένη έκφραση των γονιδίων αυτών (εικόνα 38).



Εικόνα 38 qRT-PCR αναλύσεις σε MDA.MB.231 κύτταρα και KD PML, καθώς επίσης και σε κύτταρα που απομονώθηκαν από τους πρωτογενείς όγκους και από τους πνεύμονες που είχαν μεταστάσεις. Κάθε ομάδα από τις κυτταρικές σειρές του όγκου και του πνεύμονα συγκρίθηκαν με την αντίστοιχη μητρική σειρά control & KD PML. Τα γονίδια που μελετήθηκαν σχετίζονται με πνευμονικές μεταστάσεις σύμφωνα με τη βιβλιογραφία(Minn et al. 2005)

Το MMP1 μαζί με τις MMP7, MMP9 και MMP12, μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ύλης (MMPs), σχετίστηκαν με αυξημένη έκφραση σε καρκίνο του πνεύμονα συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς σε διάφορους τύπους συμπαγών όγκων, συμπεριλαμβανομένου του πνευμονικού αδενοκαρκινώματος (AC) (Weiqing Li et al. 2018)

Ανάμεσα στις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, η FASCIN έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον καθώς η αυξημένη έκφραση της στα invadopodia έχει συσχετιστεί με την εξέλιξη του καρκίνου κ τη μετάσταση. Η αύξηση της έκφρασης της έχει συσχετιστεί με την επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT) και με την αύξηση κινητικότητας και διεισδυτικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων (Machesky and Li 2010).

Η οικογένεια γονιδίων ID (Inhibition of cell Differentiation-ID1 έως ID4) εκφράζεται σε εμβρυϊκά προγονικά κύτταρα και σε ορισμένους ιστούς ενηλίκων και ελέγχουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων, ανταγωνίζοντας την πρόσδεση στο DNA των bHLH

πρωτεϊνών. Η αυξημένη έκφραση του έχει συσχετιστεί με πνευμονικές μεταστάσεις στον καρκίνο του μαστού και μάλιστα ιστοειδικά με την αυξημένη έκφραση να περιορίζεται στον ιστό των πνευμόνων και στα ενδοθηλιακά περιβάλλοντα κύτταρα σε συνεργασία με την ID3 (G. P. Gupta et al. 2007).

Η PML πιθανά ρυθμίζει την επιθηλιακότητα των MDA.MB.231 εμποδίζοντας τη δράση των ΕΜΤ παραγόντων

Σε πειράματα qRT-PCR που πραγματοποιήθηκαν για τους ΕΜΤ βασικούς παράγοντες ανάμεσα στα MDA.MB.231 και MDA.MB.231 KD PML παρατηρήθηκε μείωση των TWIST1,2,SNAIL και αύξηση του SLUG γονιδίου (εικόνα 38 A). Αντίθετα όταν έγινε σύγκριση των πρωτογενών όγκων αντιστοίχως, παρατηρήθηκε αύξηση στις KD ομάδες για τα TWIST2 και SLUG γονίδια (εικόνα 39).





Για να διασαφηνιστεί η πιθανή σχέση της PML με τους EMT παράγοντες, έγινε υπερέκφρασης της PMLIV ισομορφής, με τους EMT παράγοντες σε HEK293T κύτταρα. Από την εικόνα 40 φάνηκε πως συνεντοπίζεται με όλους EMT παράγοντες, ενώ σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, η PMLIV αλληλεπιδρά με όλες τις πρωτεΐνες, πιο ισχυρά όμως με τις TWIST2,TWIST1, ασθενέστερα με τη SLUG και ακόμα πιο λίγο με την SNAIL1.



Εικόνα 40 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της PML πρωτεΐνης σε HEK293T κύτταρα στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση της PMLIV πρωτεΐνης και των EMT παραγόντων, TWIST1,TWIST2,SNAIL1,SLUG και western blot ανάλυση για το GFP που ήταν επισημασμένοι οι EMT παράγοντες (Α). Πείραμα συνεντοπισμού της PMLIV και των TWIST2 & SLUG σε συνεστιακό μικροσκόπιο, όπου DAPI(μπλε) χρώση πυρήνων, PMLIV (κόκκινο), TWIST2 & SLUG (πράσινο) (B)

Στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε πως η PMLIV αλληλεπιδρά πιο ισχυρά με την TWIST2 σε



σχέση με άλλες ισομορφές που δοκιμάστηκαν, όπως η PMLI και η PMLIII (εικόνα 41)

Εικόνα 41 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της PML πρωτεΐνης σε ΗΕΚ293Τ κύτταρα στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση των PML I & III ισομορφών και του TWIST2 western blot ανάλυση για το GFP που ήταν επισημασμένη η TWIST2. Πείραμα συνεντοπισμού της PMLI & III και της TWIST2 σε συνεστιακό μικροσκόπιο, PMLI & III (κόκκινο), TWIST2 (πράσινο).

Οι TWIST1 και TWIST2 είναι bHLH πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν μια βασική περιοχή (basic) που προσδένεται σε E-box περιοχές του DNA. Στη συνέχεια ακολουθεί μια HLH περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεΐνες, σχηματίζοντας όμο ή ετεροδιμερή σύμπλοκα. Η bHLH περιοχή είναι συνολικού μήκους 60 αμινοξέων(Jones 2004)



Η PML αλληλεπιδρά με HLH πρωτεΐνες, όπως είναι η c-Myc, παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε όταν η TWIST2 πρωτεΐνη «κόπηκε» σε κομμάτια και παρατηρήσαμε πως αλληλεπιδρά μόνο με το bHLH τμήμα της (εικόνα 42).



Εικόνα 42 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της PML πρωτεΐνης σε ΗΕΚ293Τ κύτταρα στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση της PMLIV και των τμημάτων της TWIST2. Western blot ανάλυση για το GFP που ήταν επισημασμένη η TWIST2. Πείραμα συνεντοπισμού της PMLIV και των τμημάτων της TWIST2 σε συνεστιακό μικροσκόπιο, PMLIV (κόκκινο), TWIST2 (πράσινο).

Η αλληλεπίδραση της PML με την TWIST2 πρωτεΐνη ενδεχομένως οδηγεί στη μείωση της έκφρασης της CD24, σε επίπεδο κυτταρικής σειράς αλλά και σε επίπεδο πρωτογενών όγκων (εικόνα 43) και αποτελεί ένδειξη της διατήρησης της επιθηλιακότητας των κυττάρων από την PML μέσω της TWIST2 πρωτεΐνης και της CD24.



Εικόνα 43 qRT-PCR αναλύσεις για το CD24 & PML σε MDA.MB.231 κύτταρα και KD PML, καθώς επίσης και σε κύτταρα που απομονώθηκαν από τους πρωτογενείς όγκους και από τους πνεύμονες που είχαν μεταστάσεις.

Συγκρίνοντας τα MDAMB231 DEGs που αναφέρθηκαν παραπάνω με γνωστούς TWIST1 στόχους (Bildsoe et al. 2016), ομόλογους για ανθρώπινα κύτταρα, διαπιστώθηκε ότι 55 γονίδια διαφορικά εκφραζόμενα στα MDAMB231 KD PML, είναι στόχοι του TWIST1 (εικόνα 44) (λίστα γονιδίων στο Παράρτημα).



Εικόνα 44 Σύγκριση γονιδίων διαφορικώς εκφραζόμενα στα MDAMB231 KD PML που αποτελούν στόχους της TWIST πρωτεΐνης.

Σε ανάλογη σύγκριση με στόχους της TWIST2 για τα MDAMB231 (<u>https://signor.uniroma2.it/relation_result.php?id=Q8WVJ9</u>) (εικόνα 45), εντοπίστηκαν 20 παράγοντες, 3 από τα οποία ήταν στα DEGs της ομάδας μελέτης.

gene_id <fctr></fctr>	gene_name <fctr></fctr>	log2_normalized_FC_ShGFP_vs_ShPML <dbl></dbl>
ENSG0000090339	ICAM1	-0.7382765
ENSG0000130513	GDF15	-1.1461518
ENSG00000149311	ATM	-0.9653390

Παρόλο που η CDH1 είναι στόχος της TWIST2 δεν ήταν στα DEGs, βρέθηκε σε αναλύσεις qRT-PCR μειωμένη στα MDAMB231 KD PML (εικόνα 23 Α)



Εικόνα 45 TWIST2 στόχοι. Πηγή <u>https://signor.uniroma2.it/relation_result.php?id=Q8WVJ9</u>

Η ΡΜΙ αλληλεπιδρά κατ'εξοχήν με τις μεταλλαγμένες μορφές της p53

Το p53 γονίδιο μπορεί να εκφραστεί σε 9 διαφορετικές εκδοχές της πρωτεΐνης και οι διάφορες μεταλλαγμένες μορφές λειτουργούν συνεργατικά ή κατασταλτικά έναντι της φυσιολογικής δράσης της P53 πρωτεΐνης (Khoury and Bourdon 2010). Οι σημειακές μεταλλάξεις στο p53 γονίδιο είναι πολύ συχνό φαινόμενο στον καρκίνο του μαστού με κακή πρόγνωση για τον ασθενή. Τα MDA.MB.231 κύτταρα φέρουν τη σημειακή μετάλλαξη 280, μέσα στην DNA binding domain της πρωτεΐνης, όπου μια αργινίνη αντικαθίσταται από μια λυσίνη (p53R280K) και αποτελεί gain of function (GOF) μετάλλαξη.

Σε πειράματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών της παρούσας εργασίας η αποσιώπηση της PML οδήγησε στη μείωση της μικρής ισομορφής β της p53 που φυσιολογικά εκφράζεται στον μαστό (εικόνα 46). Μιας και η φυσιολογική p53 αλληλεπιδρά με την PML (A. Guo et al. 2000), θελήσαμε να δούμε αν οι μεταλλαγμένες εκδοχές της αλληλεπιδρούν την PML πρωτεΐνη. Χρησιμοποιήσαμε τις μεταλλαγές R175H, R273H (M. P. Kim and Lozano 2018) που σχετίζονται με τη μετάσταση και την 326 truncation υπερεκφράζοντας τες σε HEK293T κύτταρα μαζί με την PMLIV. Πράγματι οι R175H και R273H συνεντοπίζονται με την PMLIV στα PML-NBs (εικόνα 46 A), καθώς επίσης συγκατακρημνίζονται (εικόνα 45 C).



Εικόνα 46 Πείραμα συνεντοπισμού της PMLIV και των μεταλλαγμένων μορφών της TP53 R175H, R273H σε συνεστιακό μικροσκόπιο, PMLIV (κόκκινο), TP53 (πράσινο) (A). WB-blot ανάλυση για την έκφραση της TP53 πρωτεΐνης στα MDAMB231 (p53_R280K), στα T47 (p53_R280K) και MCF7 (TP53 wild-type) (B). Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της PML πρωτεΐνης σε HEK293T κύτταρα στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση της PMLIV και των TP53 wild type & R273K. Western blot ανάλυση για το GFP που ήταν επισημασμένη η TP53 (C).

Όταν έγινε σύγκριση μεταξύ γνωστών στόχων της p53 wt πρωτεΐνης εντοπίστηκαν 21 γονίδια στόχοι στα DEGs των MDAMB231 (εικόνα 47) (λίστα με τα γονίδια στο παράρτημα).



Εικόνα 47 Σύγκριση γονιδίων διαφορικώς εκφραζόμενα στα MDAMB231 KD PML που αποτελούν στόχους της p53

Από αυτά 8 σχετίζονται με την κυτταρική μετακίνηση.

Functional enrichment in p53 targets and DEGs from MDA.MB.231

 DESCRIPTION
 term_id
 P-value
 GENES

 cell migration
 GO:0016477
 0.033285 STC1,VCAN,RHOB,TGFBR2,TRIB1,PLXNA2,MERTK,HDAC9,FSCN1

Το γεγονός ότι η PML αλληλεπιδρά με τις μεταλλαγμένες μορφές της p53 πρωτεΐνης και με την απαλοιφή του PML γονιδίου υπάρχει ενίσχυση του μεταστατικού φαινοτύπου στα MDA.MB.231 *in vivo*, υποδηλώνει ενδεχομένως πως η PML ανταγωνίζεται τη δράση της p53 mut που φέρουν τα MDA.MB.231.

Μελετήσαμε στη συνέχεια και συγκρίναμε, από την TCGA βάση δεδομένων, την κατάσταση της p53 (φυσιολογική-wild-type ή μεταλλαγμένη) σε σχέση με τον χρόνο επιβίωσης των ασθενών με claudin-low TNBC καρκίνο (εικόνα 48).

Στη συνέχεια συγκρίναμε τη γονιδιακή έκφραση της PML σε σχέση με την κατάσταση της P53. Στην περίπτωση των ασθενών με φυσιολογική p53 η έκφραση της PML (χαμηλή ή υψηλή) δεν φαίνεται να επηρέασε τον χρόνο επιβίωσης (survival probability). Αντίθετα όταν η P53 ήταν μεταλλαγμένη, τα επίπεδα έκφρασης του PML γονιδίου επηρέασε σημαντικό τον χρόνο επιβίωσης συμβάλλοντας θετικά στον χρόνο επιβίωσης (εικόνα 49).



P53 mut

Gray P=0.012





Εικόνα 49 Γράφημα όπου απεικονίζεται η συσχέτιση της έκφρασης του PML σε σχέση με την p53 σε ασθενείς με claudin-low TNBC καρκίνο στον χρόνο επιβίωσης των ασθενών. Τα δεδομένα για την έκφραση των

γονιδίων και τον χρόνος επιβίωσης είναι από την TCGA βάση δεδομένων. Τιμές κάτω από τη μέση έκφραση του PML (below median expression/bm) και τιμές πάνω από τη μέση έκφραση του PML (above median expression/am)

Με τον ίδιο τρόπο συγκρίναμε την έκφραση των ID1 και ID3 που σχετίζονται με τις πνευμονικές μεταστάσεις του καρκίνου του μαστού (Stankic et al. 2013) με την PML ανάλογα την κατάσταση της p53 (εικόνα 50). Παρατηρούμε ότι, ενώ στη περίπτωση της φυσιολογικής p53 δεν υπάρχει ουσιαστική αλλαγή στην έκφραση των ID1/3 και PML, στην περίπτωση της μεταλλαγμένης p53 η έκφραση των ID1/3 είναι ανάλογη της PML (εικόνα 50). Παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε για την κυτταρική σειρά MDAMB231 όταν έγινε αποσιώπηση του PML γονιδίου (εικόνα 37).



Εικόνα 50 Γράφημα που απεικονίζει την έκφραση των ID1 και ID3 συγκριτικά με την PML ανάλογα την κατάσταση της p53 από δείγματα ασθενών με Claudin-low TNBC (TCGA βάση δεδομένων).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της PML πρωτεΐνης στον καρκίνο του μαστού, χρησιμοποιήθηκαν 2 κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού, διαφορετικές φαινοτυπικά, τα claudin-low MDAMB231 καθώς και τα luminal A MCF7, στις οποίες έγινε αποσιώπηση όλων των ισομορφών της PML πρωτεΐνης. Παλαιότερες έρευνες του εργαστηρίου έδειξαν ότι η επαγώμενη υπερέκφραση του PMLIV στα MDA.MB.231 κύτταρα προκάλεσε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Sachini et al. 2019) . Η ολική απαλοιφή της PML αύξησε την πολλαπλασιαστική ικανότητα των MCF7, ενώ στα MDAMB231 δεν είχε ανάλογο αποτέλεσμα. Συνεπώς η συνολική συνεισφορά των διαφορετικών ισομορφών της PML στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι πολύπλοκη και ειδική για τον κυτταρικό τύπο.

Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες ογκοσφαιρών, τα MCF7 KD PML κύτταρα απέκτησαν πιο grape-like μορφολογία, παρόμοια με τα MDAMB231, σε σχέση με τις στρογγυλές σφαίρες που φυσιολογικά σχηματίζουν (Borgna et al. 2012), υποδηλώνοντας ότι ίσως απομακρύνονται από τον αμιγώς επιθηλιακό τους χαρακτήρα. Πράγματι και στη μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων η μορφολογία των κυττάρων άλλαξε με τα κύτταρα να είναι περισσότερο μονήρη σε σχέση με την ομάδα αναφοράς που είχαν στενές συνδέσεις με τα γειτονικά τους κύτταρα. Αντίθετα στα MDA.MB.231 αν και δεν άλλαξε ουσιαστικά η μορφολογία των ογκοσφαιρών, αξιοσημείωτη ήταν η μείωση της του αριθμού που σχημάτιζαν, παρατήρηση η οποία συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα, στα οποία η PML είναι απαραίτητη για το σχηματισμό ογκοσφαιρών στα TNBC (Martín-Martín et al. 2016). Τα claudin-low κύτταρα εμφανίζουν μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά και αποτελούν τα πιο μεταστατικά κύτταρα από τους διάφορους υπότυπους του καρκίνου του μαστού (Prat and Perou 2011). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως ιδιαίτερα μεταστατικά κύτταρα του μαστού εκφράζουν τον συνδυασμό των επιφανειακών δεικτών CD44⁺/CD24^{low/-} (Meyer et al. 2009; Sheridan et al. 2006). Σύμφωνα με την μελέτη των Fillmore και Kupperwaser, που μελέτησαν οχτώ καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού, διαπιστώθηκε ότι οι CD44⁺/CD24^{-/low} κλώνοι ήταν ικανοί να αυτοανανεώνονται περισσότερο και να αναπτύσσουν όγκους (Fillmore and Kuperwasser 2008). Ανάλογη παρατήρηση έγινε και σε άλλη μελέτη με ΤΝΒC δείγματα ασθενών, όπου διαπιστώθηκε ότι οι όγκοι ήταν εμπλουτισμένοι στον CD44⁺/CD24^{low/-} φαινότυπο και είχαν μεγαλύτερο ποσοστό επανεμφάνισης του όγκου ή εμφάνισης μεταστάσεων (Idowu et al. 2012). Πράγματι στην περίπτωση των MDAMB231 KD PML, ο φαινότυπος των κυττάρων ήταν CD44⁺/CD24^{low/-}. Χαρακτηριστικά τα MDAMB231 εμφανίζουν ένα μικρό ποσοστό διπλά θετικών κυττάρων

CD44⁺/CD24⁺, το οποίο χάνεται στα MDAMB231 KD PML, <u>υποδηλώνοντας μείωση της</u> επιθηλιακότητας τους όταν λείπει η PML.

Στα πειράματα *in vitro* που πραγματοποιήθηκαν υπήρξε ενίσχυση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές μετά την αποσιώπηση της PML. Η αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με την αύξηση της φωσφορυλίωσης της STAT3 πρωτεΐνης, η οποία σχετίζεται με την μετακίνηση των κυττάρων (Xie, Li, and Zhang 2018). Μικρή αύξηση παρατηρήθηκε και στη βιμεντίνη που είναι χαρακτηριστικός δείκτης των μεσεγχυματικών κυττάρων (Du and Shim 2016).

Από την ανάλυση των μεταγραφικών προτύπων των δύο κυτταρικών πληθυσμών μελέτης προέκυψε η μείωση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική προσκόλληση και τις στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων και στις δύο ομάδες κυττάρων. Η αλληλούχιση των 3'UTR άκρων των MDAMB231 & MDAMB231 KD PML μας υπέδειξε την απορρύθμιση αρκετών γονιδίων, ενώ η λειτουργική ανάλυση συσχέτισε τα αυξημένα γονίδια με μηχανισμούς του κυτταρικού κύκλου. Σε έναν πληθυσμό όμως με ιδιαίτερα αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό είναι δύσκολο να προσδιορίσουμε βιολογικά την απορρύθμιση του. Από την άλλη μεριά τα μειωμένα γονίδια σχετίζονταν με την κυτταρική προσκόλληση, όπως προαναφέρθηκε, τη ρύθμιση μικρών RNA και ενός μονοπατιού σχετικού με την ΕΜΤ. Η πλήρης αλληλούχιση του RNA στα MCF7 & MCF7 KD PML δεν μας έδωσε τόσο δυναμική πληροφορία. Μόνο δύο μονοπάτια σχετίστηκαν με τα μειωμένα γονίδια, το TNFa και το σηματοδοτικό μονοπάτι των ιντεγκρινών. Ενώ τα αυξημένα γονίδια σχετίστηκαν με την κυτταρική προσκόλληση. Από τους παράγοντες που εξέταστηκαν από τα DEGs, η SLIT2, πρωτεΐνη που αναστέλλει τη μετάσταση (Prasad et al. 2008; Yiin et al. 2009), ήταν μειωμένη γεγονός που επιβεβαίωσε της αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων in vitro και στους δύο κυτταρικούς τύπους.

Σε συνέχεια της μελέτης μας, όταν ενέσαμε τα κύτταρα μελέτης υποδόρια σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, στα MDAMB231 KD PML κύτταρα αναπτύχθηκαν μεγαλύτεροι όγκοι. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με την *in vitro* δοκιμασία σφαιρών που προηγήθηκε. Το μικροπεριβάλλον, όμως, και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες δημιουργούνται οι όγκοι, διαφέρει ανάμεσα στις *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες. Οι υποξικές συνθήκες, η αλληλεπίδραση με άλλους τύπους κυττάρων και των παραγόντων που εκκρίνουν στον όγκο του πειραματόζωου, σε αντίθεση με τις νορμοξικές στείρες συνθήκες που καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα ώστε να κάνουν σφαίρες, είναι ένδειξη της πολυπλοκότητας που υπάρχει γύρω από τη μελέτη του καρκίνου (Zhou et al. 2019).

Το μικροπεριβάλλον του όγκου, στο σύνολο του, συμβάλλει στην επιλογή των υποκλώνων κυττάρων που τελικά θα αναπτυχθούν. Πράγματι κύτταρα που απομονώθηκαν από τους πρωτογενείς όγκους και καλλιεργήθηκαν εκ νέου προς σχηματισμό σφαιρών in vitro, διαπιστώθηκε ότι είχαν σχεδόν 2 φορές μεγαλύτερο αριθμό σφαιρών στα KD PML κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση του μικροπεριβάλλοντος αναφορικά με τον φαινότυπο των κυττάρων. Η ετερογένεια που εμφανίζουν οι καρκινικοί κυτταρικοί πληθυσμοί αφορά την ύπαρξη γενετικών μεταλλάξεων, επιγενετικών τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων με το μικροπεριβάλλον. Ακόμα και σε σταθερές κυτταρικές σειρές, υπάρχει μεγάλη ετερογένεια με διαφορετικό δυναμικό βλαστικότητας και μεταστατικότητας δημιουργώντας προβλήματα στην μακροπρόθεσμη αντιμετώπιση της νόσου (Amaro et al. 2016). Ο μητρικός καρκινικός πληθυσμός μπορεί να πολλαπλασιάζεται γρηγορότερα σε σχέση με τους μεταστατικούς απογόνους του και αυτό γιατί έχοντας πολλούς υποκλώνους μπορεί η αλληλεπίδραση μεταξύ τους, μέσω των παραγόντων που εκκρίνουν και των εξωσωμάτων, να συμβάλλει στην καλύτερη πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων (Martín-Pardillos et al. 2019). Οι προϋπάρχουσες μεταλλάξεις που φέρουν οι διάφοροι υποκλώνοι μέσα σε έναν όγκο μπορεί να προσφέρουν πλεονέκτημα επιβίωσης σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα μέσα στον ίδιο συμπαγή όγκο. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που αποκτούν αυτό το πλεονέκτημα δίνουν γένεση στους μεταστατικούς απογόνους τους που είναι ιδιαίτερα σταθεροί χωρίς να αποκτούν νέες μεταλλάξεις. Στην περίπτωση των MDAMB231 όταν μελετήθηκαν οι μεταστατικοί κλώνοι από τον πνεύμονα, είχαν την μετάλλαξη BRAF και είχε χαθεί το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενισχύοντας τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων άλλα και την ικανότητα τους να κάνουν νέες απομακρυσμένες εστίες (Jacob et al. 2015). Με βάση τα παραπάνω μία μελλοντική κατεύθυνση μελέτης θα ήταν η συγκριτική διερεύνηση της κλωνικής εξέλιξης σε κύτταρα φυσιολογικά η KD για την PML πρωτεΐνη in vivo με γενετική σήμανση των κυττάρων πριν την εμφύτευση ή τη στοχευμένη αλληλούχιση εμπλουτισμού αλληλόμορφων ογκογονιδίων, όπως πιο πάνω.

Η παθολογοανατομική ανάλυση των πρωτογενών όγκων έδειξε μειωμένη νέκρωση στους MDAMB231 KD PML όγκους μας, που υποδηλώνει αυξημένη αγγείωση. Χαρακτηριστικά η PML πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τον κύριο μεταγραφικό διαβιβαστή της υποξίας HIF1a. Είναι ενδιαφέρον ότι σε κύτταρα από τους πρωτογενείς όγκους των MDAMB231 KD PML επιβεβαιώσαμε την αύξηση των στόχων του HIF1a, VEGFa και PGK1. Η PML φαίνεται ότι ρυθμίζει την αγγειογένεση με διάφορους τρόπους *in vivo*, είτε μέσω της αναστολής του mTOR μονοπατιού, είτε ρυθμίζοντας απευθείας αρνητικά τον HIF1a. Τα HIF

88

σύμπλοκα που δημιουργούνται στις υποξικές συνθήκες των όγκων επάγουν την έκφραση παραγόντων που σχετίζονται με την νεοαγγείωση και τη μετάσταση. Νεότερες μελέτες σχετικά με κυκλοφορούντα microRNAs ή μικροκυστίδια (MVs) τα έχουν υποδείξει ως πιθανούς νέους βιοδείκτες και θεραπευτικούς στόχους για τον καρκίνο. Η PML πιθανά ρυθμίζει αρνητικά την έκκριση μικροκυστιδίων, τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη των αγγείων που τους περιβάλλουν (Bernardi et al. 2006; Pawlus, Wang, and Hu 2014; Yamada et al. 2014). Συμπεραίνουμε ότι πιθανά η PML έχει παρόμοια δράση στα καρκινικά κύτταρα μέσω του μονοπατιού mTOR, πράγμα που είναι στα μελλοντικά υπό διερεύνηση ερωτήματα.

Μια από τις βασικές παρατηρήσεις αυτής της μελέτης είναι η αυξημένη πνευμονική μεταστατικότητα. Η επαγωγή ενδεχομένως της αγγειογένεσης μπορεί να συνέβαλλε στην ενίσχυση της μεταστατικότητας που παρατηρήσαμε στα MDAMB231 KD PML κύτταρα *in vivo.* Η αυξημένη μεταστατικότητα έρχεται, μερικώς, σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις του Ponente και των συνεργατών του, αναφορικά με την έκφραση της PML σε TNBC κύτταρα και την μεταστατικότητα των κυττάρων (Ponente et al. 2017). Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα ανάμεσα στις δύο μελέτες, ενδεχομένως, εξηγούνται από την πιθανή ύπαρξη διαφορετικών υποκλώνων στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν και «επιλέχθηκαν» *in vivo,* αλλά και τον βαθμό αποσιώπησης της PML που στην περίπτωση μας είναι πολύ ισχυρός. Αναφορικά με τις μεταστάσεις, <u>για πρώτη φορά είδαμε ότι η αποσιώπηση του PML γονιδίου οδήγησε τα κύτταρα στην δημιουργία, κυρίως, πνευμονικών μεταστάσεων</u>.

Σύμφωνα με τον Minn και τους συνεργάτες του ο εμπλουτισμός έκφρασης μιας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων σχετίζεται με τις μεταστάσεις στον πνεύμονα. Από την σύγκριση των DEGs με τη γονιδιακή υπογραφή για την μετάσταση στον πνεύμονα προέκυψε από την λειτουργική ανάλυση, η εμπλοκή του TGF-β μονοπατιού στο EMT, η οποία φαίνεται πως επάγει την ανάπτυξη πνευμονικών μεταστάσεων (Forrester et al. 2005; Minn et al. 2005). Παρατηρήσαμε ότι ορισμένα από τα γονίδια της πνευμονικής υπογραφής, όπως το ID1, FASCIN και MMP1 είναι αυξημένα στα MDAMB231 KD PML κύτταρα που απομονώθηκαν από τις πνευμονικές μεταστάσεις. Η αυξημένη έκφραση του ID1 έχει συσχετιστεί με πνευμονικές μεταστάσεις στον καρκίνο του μαστού και μάλιστα ιστοειδικά με την αυξημένη έκφραση της να περιορίζεται στον ιστό των πνευμόνων και στα ενδοθηλιακά περιβάλλοντα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα η ID1 ρυθμίζεται από τον TGF-β σε μεταστατικά κύτταρα του μαστού στον πνεύμονα, ώστε να γίνει μια MET (μεσεγχυματικήεπιθηλιακή μετάβαση) απαραίτητα για να μπορούν να δημιουργηθούν οι

89

μακρομεταστάσεις συνεργατικά με την ID3 (G. P. Gupta et al. 2007; Stankic et al. 2013). Σε αντίθεση με τα προηγούμενα η έκφαρση των FASCIN, ID1 και MMP1 ήταν μειωμένη και στις δύο κυτταρικές σειρές σε καλλιέργεια μετά την αποσιώπηση του PML γονιδίου. Η PML όμως δρά σε πολλαπλά επίπεδα και τα μειωμένα RNA επίπεδα δεν αντικατοπτρίζουν την *in vivo* κατάσταση που προέκυψε στη συνέχεια.

Με αφορμή την ενίσχυση της μεσεγχυματικότητας των κυττάρων, ελέγξαμε την έκφραση των βασικών ΕΜΤ παραγόντων στην κυτταρική σειρά των MDAMB231 KD PML όπου διαπιστώσαμε μεταγραφικά αύξηση μόνο στην TWIST2 και στη SLUG στους πρωτογενείς όγκους. Θελήσαμε να δούμε την ύπαρξη άμεσης πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της PML και των βασικών ΕΜΤ παραγόντων, όπου και διαπιστώσαμε ότι η PML , ειδικά δε η ισομορφή IV, αλληλεπιδρά πιο ισχυρά με την TWIST2 και λιγότερο με την SLUG πρωτεΐνη στα PML-NBs. Είναι ενδιαφέρον ότι όλες οι πρωτεΐνες όπως, και ο HIF1a διαθέτουν την bHLH περιοχή διμερισμού και πρόσδεσης στο DNA.

Η FASCIN ρυθμίζεται από την SLUG πρωτεΐνη ως απόρροια της ενεργοποίησης του ΕΜΤ προγράμματος στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα. Η SLUG πρωτεΐνη ανήκει στους zinc finger μεταγραφικούς παράγοντες. Ο υποκινητής της SLUG έχει μια E-box περιοχή (CAGGTG) οποία προσδένονται bHLH πρωτεΐνες. Εκφράζεται στην στην βασική/μυοεπιθηλιακή στιβάδα του μαστού και είναι απαραίτητη για την διατήρηση των βασικών χαρακτηριστικών του. Έχει δειχθεί πως η SLUG προσδένεται στον υποκινητή της Ε-Cadherin καταστέλλοντας την έκφραση της (Phillips and Kuperwasser 2014). Στους πληθυσμούς CD44⁺/CD24 κυττάρων του μαστού η SLUG και η TWIST πρωτείνη έχουν ενισχυμένη έκφραση και μάλιστα η TWIST προσδένεται στον υποκινητή του CD24 μόνη της είτε μαζί με άλλους παράγοντες ρυθμίζοντας την έκφραση της. Ανάλογη παρατήρηση έκαναν ο Yi Liu με τους συνεργάτες τους όταν μελέτησαν την TWIST2 σε ηπατική βλαστικά καρκινικά κύτταρα (HCC) και είδαν ότι η TWIST2 προσδένεται στην E-box περιοχή του CD24 ρυθμίζοντας την έκφραση του(Bhat-Nakshatri et al. 2010; Liu et al. 2014; Vesuna et al. 2009). Στην περίπτωση μας, λοιπον, δείξαμε ότι η PMLIV αλληλεπιδρά με την HLH περιοχή των ΕΜΤ παραγόντων, που υποδηλώνει ότι η PML επηρεάζει μεταγραφικούς στόχους των ΕΜΤ παραγόντων. Αυτό πιθανά εξηγεί τη μείωση της επιθηλιακότητας και αύξηση της μεταστατικότητας σε συνθήκες που υπάρχει έκφραση των ΕΜΤ παραγόντων, όπως στα MDAMB231, αλλά όχι στα MCF7 που δεν τους εκφράζουν. Η έκτοπη έκφραση EMT παραγόντων σε MCF7 κύτταρα παρουσία ή απουσία PML θα δώσει μία άμεση απάντηση στο ερώτημα για τον ανασταλτικό ρόλο του PML στη EMT.

Οι μεταλλαγμένες μορφές της p53 είναι οι πιο συχνές προ-ογκογονικές μεταλλάξεις στον καρκίνο και σχετίζονται με κακή πρόγνωση των ασθενών. Η θεραπευτική στόχευση της παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον (Blandino and Di Agostino 2018; Mantovani, Walerych, and Sal 2017; Powell, Piwnica-Worms, and Piwnica-Worms 2014). Τα MDAMB231 φέρουν τη σημειακή μετάλλαξη R280K, ενώ στα MCF7 διατηρείται και εκφράζεται η φυσιολογική p53. Αναλύσαμε και συγκρίναμε από την TCGA βάση δεδομένων την επιβίωση των ασθενών αναφορικά με την κατάσταση της p53 και την έκφραση της PML. Διαπιστώσαμε ότι <u>η υψηλή</u> <u>έκφραση της PML σε ασθενείς με μεταλλαγμένη p53 βελτίωσε τον χρόνο επιβίωσης.</u> Αντίθετα όταν η p53 ήταν φυσιολογική ο χρόνος επιβίωσης δεν σχετιζόταν με την έκφραση της PML. Ίσως αυτό εξηγεί τον φαινότυπο στα MCF7 κύτταρα in vivo ο οποίος δεν άλλαξε μετά την αποσιώπηση του PML. Η έκφραση των ID1 και ID3 στους Claudin-low TNBC ήταν ανάλογη της PML. Η PML είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί τη δράση της p53 για γήρανση και απόπτωση (Bernardi et al. 2004; Ivanschitz et al. 2015). Η πιθανή ανταγωνιστική σχέση μεταξύ μεταλλαγμένης p53 και PML πιθανώς εξηγείται από την ισχυρή αλληλεπίδραση που επιβεβαιώσαμε μεταξύ των p53 R175K/R275K και της PMLIV στα PML-NBs ή και αναστολή καθοδικών στόχων της p53 από την απαλοιφή της PML. Η μεταλλαγμένη p53 επηρεάζει την πορεία της νεοπλάσιας με πολλαπλούς μηχανισμούς, κυρίως αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες και τροποποιεί την ΕΜΤ, επάγει τη σηματοδότηση μέσω RTK, τις αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια ουσία, ρυθμίζοντας τον μιτοχονδριακό μεταβολισμό, αλλά και μη κωδικά RNAs, την έκκριση εξωσωμάτων κλπ (Tang et al. 2020). Πειράματα εισαγωγής μεταλλαγμένης p53 σε MCF7 κύτταρα παρουσία ή απουσία της PML πρωτεΐνης βρίσκεται σε εξέλιξη στο εργαστήριο για περαιτέρω διερεύνηση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Η PML είναι μια πρωτεΐνη με πολλούς ρόλους στη βιολογία των κυττάρων. Με ανάλογο τρόπο φαίνεται ότι δρά και στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ανάλογα το γονιδιακό υπόβαθρο των κυττάρων και το περιβάλλον που αναπτύσσονται, η PML δρά διαφορετικά. Στο δικό μας σύστημα μελέτης η PML συμβάλλει στην διατήρηση των επιθηλιακών χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων.



Ρυθμίζει την αγγειογένεση πιθανώς, μέσω του HIF1a-VEGFa άξονα και με αυτόν τον τρόπο τη μεταστατικότητα των κυττάρων, ιδιαίτερα σε κυτταρικούς τύπους που η p53 είναι μεταλλαγμένη. Τέλος η PML συντηρώντας τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά στα κύτταρα πιθανώς εμποδίζει την επαγωγή της ID1 με σκοπό τη δημιουργία πνευμονικών μεταστάσεων.



Είναι σημαντικό να ερευνηθεί εάν η απαλοιφή του PML επηρεάζει στην αρμοστικότητα (fitness) και την εξελικτικότητα των κυτταρικών πληθυσμών *in vitro* και ακόμα περισσότερο *in vivo*. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι ακόμα και καθιερωμένες κυτταρικές σειρές, με ή χωρίς εξωγενές στρες, υπόκεινται σε κλωνική επιλογή. Είναι ενδιαφέρον να δούμε εάν η απαλοιφή του PML επηρεάζει την κλωνική αρχιτεκτονική των MDAMB231 *in vitro* ή ακόμα περισσότερο *in vivo*, σε συνδυασμό με τη μελέτη των γονιδιακών προτύπων έκφρασης RNA και εάν αυτό συμφωνεί με τη μεταστατικότητα.

Για πρώτη φορά είδαμε πως με την απαλοιφή της PML τα MDAMB231 ανέπτυξαν πολύ ταχύτερα πνευμονικές μεταστάσεις. Τα *in vivo* στοιχεία, τα μεταγραφικά πρότυπα και η επικάλυψη στόχων της p53 και PML συγκλίνουν στη πιθανότητα ο ανταγωνισμός μεταξύ της PML και της p53 να είναι υπεύθυνος για πολλά, αν όχι για όλα τα αποτελέσματα μας. Μεταξύ αυτών, καθώς ολοένα και περισσότερα δεδομένα συνηγορούν στη συσχέτιση των εξωσωμάτων με τον οργανοτροπισμό των καρκινικών κυττάρων, και οι μεταλλαγές της p53 προάγουν την αναπτυξη όγκου μέσω εξωσωμάτων (Cooks et al. 2018) σχεδιάζουμε τη συγκριτική μελέτη του φορτίου και της δράσης εξωσωμάτων στη πνευμονική μεταστατικότητα. ΜΕΡΟΣ ΙΙ Μελέτη του ρόλου της PML στα WJ-MSCs

Εισαγωγή

Στελεχιαία/Στρωματικά Μεσεγχυματικά Κύτταρα (Mesenchymal Stromal/ Stem Cells – MSCs)

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells - MSCs) είναι τα πιο γνωστά πολυδύναμα κύτταρα. Μπορούν να προέλθουν από ένα μεγάλο αριθμό ιστών συμπεριλαμβανομένων του μυελού, του λιπώδους. ιστού, των οστών, της γέλης του Wharton, του αίματος του ομφάλιου λώρου και του περιφερικού αίματος. Αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες, έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται εκτενώς και να διαφοροποιούνται *in vitro* υπό συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, προς ποικίλους κυτταρικούς τύπους όπως οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα. (Augello, Kurth, and De Bari 2010; Gang et al. 2004)

Το γεγονός πως MSCs, παρόμοια με αυτά του μυελού, έχουν μέχρι σήμερα απομονωθεί και από διάφορες άλλες πηγές, υποδεικνύει ότι ίσως να υπάρχει ένα δίκτυο μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που μεταναστεύει από την κύρια πηγή (το στρώμα του μυελού) στους διάφορους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και στη συνέχεια αποκτά κατάλληλα χαρακτηριστικά, έτσι ώστε να συνεισφέρει στην διατήρηση και επιδιόρθωση του συγκεκριμένου ιστού (Ferrari et al. 2007; Tuan, Boland, and Tuli 2003). Παρόλη την φαινοτυπική ομοιογένεια, τα κύτταρα αυτά μπορεί να παρουσιάζουν ετερογένεια στην ικανότητα διαφοροποίησης, γεγονός που σχετίζεται με τον ιστό από τον οποίο προέρχονται (Xu et al. 2017).

Τα MSCs φαίνεται πως διαθέτουν μεταναστευτικές δυνατότητες, μπορούν να εκκρίνουν προστατευτικούς παράγοντες και έχουν κύριο ρόλο στην αναγέννηση του ιστού που έχει υποστεί κάποια βλάβη. Το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών εστιάζεται στο ευρύ δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών και στην ικανότητά τους να δημιουργούν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον και να υποστηρίζουν τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μετά από ταυτόχρονη μεταμόσχευση, γεγονός που προσφέρει πολλές ευκαιρίες στη χρήση των MSCs για γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία. Για τους ίδιους λόγους αποτελούν αντικείμενο μελέτης στο πώς επηρεάζουν την εξέλιξη του καρκίνου μιας κ ανήκουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Μπορούν να συμμετάσχουν ως μεταφορείς φαρμακευτικών στόχων καθώς μεταναστεύουν στον όγκο και να αλληλεπιδρούν μαζί του εκκρίνοντας διάφορες πρωτεΐνες ή εξωσώματα (Aboulkheyr Es et al. 2020; Ayuzawa et al. 2009; Hilfiker et al. 2011; Karnoub et al. 2007; Rachakatla et al. 2007; B. Sun et al. 2010; B. Yu, Zhang, and Li 2014).

Οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί αποτελούν μια εναλλακτική πηγή MSCs. MSCs μπορούν να απομονωθούν από τον ομφάλιο λώρο, το αμνιακό υγρό, τις χοριακές λάχνες και τον πλακούντα. Πολλές μελέτες δείχνουν πως τα βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από αυτούς τους ιστούς έχουν χαρακτηριστικά των πολυδύναμων εμβρυϊκών κυττάρων αλλά και των πολυδύναμων ενήλικων βλαστικών κυττάρων. Τα βιολογικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων και η απουσία ηθικών προβληματισμών για τις εφαρμογές τους, καθιστά αυτά τα κύτταρα υποψήφια για κυτταρικές θεραπείες και την αναγέννηση ιστών. Συγκριτικά με τα ενήλικα MSCs, οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί διαθέτουν χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα για κλινικές εφαρμογές, αναφορικά με το πολλαπλασιαστικό δυναμικό και την προσβασιμότητα τους (Bieback and Brinkmann 2010; Poloni et al. 2011). Ο ομφάλιος λώρος, αποτελεί βιολογικό απόβλητο μετά τον τοκετό και τα τελευταία χρόνια έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. MSCs έχουν εντοπιστεί τόσο στο ομφαλικό αίμα όσο και στους ιστούς του ομφαλίου λώρου., όμως η χαμηλή συχνότητα των MSCs στο ομφαλικό αίμα σε σχέση με τον μυελό και η δυσκολία στην απομόνωση τους δυσχεραίνουν τη χρήση τους σε κλινικές εφαρμογές (Perdikogianni et al. 2008; Wexler et al. 2003). Ανατομικά, ο ομφάλιος λώρος αποτελείται από δύο αρτηρίες και μία φλέβα, ενσωματωμένα μέσα σε μία ειδική βλεννώδη μήτρα πλούσια σε πρωτεογλυκάνες, που είναι γνωστή ως γέλη του Wharton, και καλύπτεται εξωτερικά από αμνιακό επιθήλιο (εικόνα 51) (Nagamura-Inoue and He 2014). Τα WJ-MSCs εγκλωβίζονται στη γέλη κατά την πρώιμη εμβρυογένεση στη διάρκεια της μετανάστευσης τους από την αορτο-γοναδική-μεσονεφρική περιοχή (aortic-gonadotropinmesonephric region) προς το εμβρυϊκό ήπαρ, μέσω του ομφαλίου λώρου (Wang et al. 2008).

Παρόμοια με τα BM-MSCs, τα MSCs του ομφαλίου λώρου φέρουν τις χαρακτηριστικές ιδιότητες που τα κατατάσσουν στην κατηγορία των MSCs. Αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται προσκολλημένα σε πλαστικές καλλιεργητικές επιφάνειες έχοντας το χαρακτηριστικό ατρακτοειδές σχήμα του ινοβλάστη. Φέρουν χαρακτηριστικά των πρόδρομων βλαστικών κυττάρων, όπως είναι η έκφραση δεικτών εμβρυϊκής προέλευσης, Oct4, Sox2, Nanog και Rex1 (C.-Y. Fong et al. 2011; Gao et al. 2013).



Εικόνα 51 φωτογραφία ομφάλιου λώρου και επισήμανση των αγγείων και των περιοχών του. (Nagamura-Inoue and He 2014)

Τα WJ-MSCs μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να εκπτυχθούν σε μεγάλους αριθμούς και αντιπροσωπεύουν μια αξιόλογη πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων, εναλλακτική του μυελού (Batsali et al. 2013).

Επιπλέον τα WJ-MSCs εκφράζουν τους εμβρυϊκούς δείκτες Oct-4, Nanog, Sox-2, c-Kit, Dnmt3b και Tert (C. Y. Fong et al. 2007; Gao et al. 2013). Η χαμηλή ωστόσο έκφραση των παραπάνω δεικτών μπορεί να εξηγεί γιατί τα WJ-MSCs δεν δημιουργούν τερατώματα *in vivo* σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Συγκριτικά με τα μυελικά MSCs, τα WJ-MSCs εκφράζουν σε υψηλότερα ποσοστά τους δείκτες πολυδυναμίας Nanog, Dnmt3b, Gabrb3, Brix, Kit και Rex1 (Nekanti et al. 2010). Αν και δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί ο ρόλος των παραπάνω δεικτών στην βιολογία των ομφαλικών μεσεγχυματικών κυττάρων, φαίνεται να αντανακλούν την πιο πρόδρομη φύση τους σε σχέση με τα μυελικά ομόλογά τους (Karahuseyinoglu et al. 2007).

Τα WJ-MSCs, πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα από τα BM-MSCs, όμως η ιικανότητα τους να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύταρα είναι πιο περιορισμένη σε σχέση με τα BM-MSCs (Batsali et al. 2017). Η φαινοτυπική αυτή διαφορά δικαιολογείται από το γεγονός ότι είναι πιο άωρα κύτταρα και φέρουν ακόμα εμβρυϊκά χαρακτηριστικά (Gao et al. 2013)

Σκοπός

Η PML είχε ισχυρό ρόλο στη ρύθμιση της βιολογίας των καρκινικών κυττάρων του μαστού, στη βλαστικότητα των TNBC (επιθηλιακά κύτταρα με μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά), της πλειοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων του ποντικού (Hadjimichael et al. 2017) και της ικανότητας αυτοανανέωσης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Ito et al. 2012). Αναρωτηθήκαμε πως αυτό επηρεάζει τη βιολογία

ενός πληθυσμού μεσεγχυματικών πολυδύναμων κυττάρων από τον ομφάλιο λώρο και συγκεκριμένα τη γέλη του Wharton (Wharton's jelly MSCs), τα οποία είναι πιο άωρα κύτταρα σε σχέση με άλλους πληθυσμούς μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, όπως τα μυελικά.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Κύτταρα μελέτης

Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από ομφάλιο λώρο (WJ-MSCs) και Μεσεγχυματικά κύτταρα από μυελό των οστών μας δόθηκαν από το εργαστήριο αιματολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Διαφοροποίηση των WJ-MSCs σε οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα.

Για την επαγωγή της διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα 80000 MSCs/cm2 απλώνονταν σε 60 mm τρυβλία Petri και αναπτύσσονταν σε καλλιεργητικό μέσο αποτελούμενο από Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG; Gibco, Invitrogen) εμπλουτισμένου με 10% FBS, 100 IU/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 0.5 mM 1-μεθυλο-3βουτυλο-ισοξανθίνη (1-methyl-3-butylisoxanthine, IBMX), 1 μM δεξαμεθαζόνη και 60 μM ινδομεθακίνη (καλλιεργητικό μέσο λιπογένεσης). Η καλλιέργεια διαρκούσε 21 ημέρες σε συνθήκες 37°C / 5% CO2 και πλήρους υγρασίας, με ανανέωση θρεπτικού ανά 3 μέρες. Ο χαρακτηρισμός των λιποκυττάρων πραγματοποιήθηκε ιστοχημικά με Oil Red Ο χρώση.

Για την επαγωγή της διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα 40000 MSCs/cm2 απλώνονταν σε 60 mm τρυβλία Petri και αναπτύσσονταν σε καλλιεργητικό μέσο αποτελούμενο από α-MEM εμπλουτισμένου με 2% FBS, 100 IU/ml πενικιλίνηστρεπτομυκίνη, 2 mM L-γλουταμίνη, 0.1 μM δεξαμεθαζόνη, 25 mg/lt φωσφορικό άλας του ασκορβικού (ascorbate-2-phosphate), και 3 mM δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH2PO4). Η καλλιέργεια διαρκούσε 14 ημέρες σε συνθήκες 37oC / 5% CO2 και πλήρους υγρασίας, με ανανέωση θρεπτικού ανά 3 μέρες. Ο χαρακτηρισμός των οστεοκυττάρων πραγματοποιήθηκε ιστοχημικά με τη χρώσεις Alizarin Red. Αναφορικά με την χρώση της Alizarin Red το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και τα κύτταρα ξεπλένονταν δυο φορές με PBS (Batsali et al. 2017).

Εκχύλιση RNA και ποσοτική αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qRT-PCR)

Η εκχύλιση του ολικού RNA έγινε χρησιμοποιώντας TRIzol (Invitrogen) / Nucleozol (Macherey-Nagel). Στη συνέχεια, 2μg RNA χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία cDNA

βιβλιοθηκών χρησιμοποιώντας το ένζυμο M-MuLV Reverse Transcriptase (Biolabs) μαζί με αναστολέα RNάσης (Biolabs) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η σχετική αφθονία κάθε γονιδιακού μετάγραφου μετρήθηκε με ποσοτικό PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας τη χρωστική SYBR Green I (Invitrogen). Η σχετική έκφραση mRNA υπολογίστηκε μετά την εξομάλυνση έναντι των επιπέδων της β-ακτίνης ή του GAPDH. Σετ εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για qPT-PCR. Η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την βλαστικότητα των κυττάρων, την οστεογένεση και τη λιπογένεση εκτιμήθηκε σε MSCs από WJ-MSCs και BM-MSCs. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων PML, των γονιδίων πλειοδυναμίας OCT4, NANOG, SOX2, του αυξητικού παράγοντα TGFbR2 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 2) που σχετίζεται με την PML στη ρύθμιση της βιολογίας των κυττάρων, του δείκτη PDGFRa (Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha) και ZEB1 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox) που εκφράζονται στα μεσεγχυματικά κύτταρα. Αναφορικά με την οστεογένεση μελετήσαμε το RUNX2 (runt-related transcription factor 2) και IBSP (Bone Sialoprotein II) και για τη λιποδιαφοροποίηση μελετήσαμε τον βασικό ρυθμιστή PPARy (peroxisome proliferator activated receptor gamma) μιας κ η οικογένεια αυτών των παραγόντων ρυθμίζεται από την PML στα HSCs. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω:

PML F: 5'- GATGGCTTCGACGAGTTCAA-3'	R: 5'- GGGCTGGCTTCCTTGGATAC-3'
GAPDH F:5'- CAGTCAGCCGCATCTTCTTT-3'	R: 5'- ACCAGAGTTAAAAGCAGCCC-3'
OCT4 F: 5'- TGCAAAGCAGAAACCCTCGT-3'	R: 5'- CTGATCTGCTGCAGTGTGGGT-3'
NANOG F: 5'-AAGGCAAACAACCACTTCT-3'	R: 5'-ATCCCTGCGTCACACCATT-3'
SOX2 F: 5'- GGACAGTTACGCGCACA-3'	R: 5'-AGTAGGACATGCTGTAGGTG-3'
TGFβR2 F: 5'-TGCCCCAGCTGTAATAGGACC-3'	R: 5'-CCATACAGCCACACAGACTT-3'
PDGFRa F: 5'-GATGAAAGCACACGGAGCTA-3'	R: 5'-CGGGCAACTTGATAGGTGAA-3'
ZEB1 F: 5'-CCCAGTTACCCACAATCGTG-3'	R: 5'-AGGGCTGACCGTAGTTGAGTA-3'
RUNX2 F: 5'- GGCCCACAAATCTCAGTCCTT-3'	R: 5'- CACTGGCGCTGCAACAAGAC-3'
IBSP F: 5'- GGGCAGTAGTGACTCATCCGAAG-3'	R: 5'- CTCCATAGCCCAGTGTTGTAGCAG-3'
PPARγ: 5' –TCAGGGCTGCCAGTTTCG-3'	R: 5' – GCTTTTGGCATACTCTGTGATCTC- 3'

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western-Blot Analysis-WB)

Χρησιμοποιήσαμε RIPA (25 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) ρυθμιστικό διάλυμα για την εκχύλιση του πρωτεϊνικού υλικού από τα κύτταρα μελέτης που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (Complete, Sigma), ενώ η

ποσοτικοποίηση του εκχυλίσματος έγινε με τη δοκιμασία Bradford. Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωση, ενώ η εμφάνιση του πρωτεϊνικών σημάτων έγινε με ECL (Thermo Scientific). Τα πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα παρακάτω:

PML	sc-377340 Santa Cruz
β-ΑCΤΙΝ	sc-47778, Santa Cruz
p21	sc-397, Santa Cruz
p-STAT3	9145S, Cell signaling
VIMENTIN	5741S, Cell signaling,
Oct-3/4	sc-5279, Santa Cruz

Ανοσοχρώσεις και μικροσκοπία

Τα κύτταρα για ανοσοχρώση καλλιεργήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και σταθεροποιήθηκαν σε 4% PFA/1X PBS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, διαπερατοποιήθηκαν με 0,5% Triton X-100/1X PBS για 10 λεπτά και ξεπλύθηκαν επανειλημμένα με 1X PBS. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάστηκαν (blocking) με 1% BSA/1X PBS για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάστηκαν με πρωτοταγή αντισώματα όλη τη νύχτα/1 ώρα. Μετά τις εκπλύσεις με PBS, προστέθηκε δευτεροταγές αντίσωμα στα δείγματα για μία ώρα. Το δευτεροταγές αντίσωμα εκπλύθηκαν με DAPI (Sigma) και τοποθετήθηκαν σε πλάκες μικροσκοπίου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με μικροσκόπιο Zeiss Axioscope 2 Plus εξοπλισμένο με σύστημα σάρωσης με λέιζερ Bio-Rad Radiance 2100 και λογισμικό απεικόνισης Lasersharp 2000.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα WJ-MSCs εκφράζουν την PML και τους παράγοντες πλειοδυναμίας

Για πρώτη φορά είδαμε την έκφραση της PML πρωτεΐνης στα WJ-MSCs καθώς επίσης και τους πυρήνες των κυττάρων τους με τα PML-NBs, ενώ παράλληλα επιβεβαιώσαμε την έκφραση και την έκφραση των παραγόντων πλειοδυναμίας OCT4 και Nanog (εικόνα 51). Τα WJ-MSCs εκφράζουν υψηλότερα τον OCT4 σε σχέση με το Nanog και δικαιολογούν την πρόδρομη φύση τους σε σχέση με άλλα MSCs (Gao et al. 2013)



Εικόνα 52 qRT-PCR Ανάλυση για τους βασικούς παράγοντες πλειοδυναμίας στα NT2 κύτταρα, WJ-MSCs και HEK293T OCT4, Nanog & SOX2 (A). Χρώση με ανοσοαποτύπωση των PML-NBs στον πυρήνα των WJ-MSCs (κόκκινος) και του OCT4 (πράσινο) σε συνεστιακό μικροσκόπιο.DAPI χρώση (μπλε) των πυρήνων (B). Πρωτεϊνική έκφραση για την PML πρωτεΐνη στα WJ-MSCs (C). n=3

Στη συνέχεια επιχειρήσαμε να αποσιωπήσουμε το PML γονίδιο και να δημιουργήσουμε σταθερούς κλώνους, όμως αυτό δεν κατέστη δυνατό αφού η μακροπρόθεσμη καλλιέργεια πρωτογενών κυττάρων με shPML οδηγούσε τα κύτταρα σε θάνατο. Γι'αυτό συνεχίσαμε με μικρές καλλιέργειες χρονικά που είχαν επιτυχώς μειωμένη την PML (εικόνα 53). Επίσης χρησιμοποιήσαμε τριοξείδιο του αρσενικού (As₂O₃) έναν γνωστό παράγοντα που αποικοδομεί την PML στην χιμαιρική PML-RAR στους ασθενείς με APL (οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία) (X.-W. Zhang et al. 2010) (εικόνα 53).



Εικόνα 53 Χρώση με ανοσοαποτύπωση των PML-NBs στον πυρήνα των WJ-MSCs (κόκκινο) σε συνεστιακό μικροσκόπιο ύστερα από αποσιώπηση του PML γονιδίου ή χρήση As₂O₃ DAPI χρώση (μπλε) των πυρήνων (A). qRT-PCR ανάλυση για το PML (B). Πρωτεϊνική έκφραση για την PML πρωτεΐνη στα WJ-MSCs (C). n=3

Η μείωση της PML μείωσε τους παράγοντες πλειοδυναμίας, παρατήρηση η οποία συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που εντάσσει την PML στις πρωτεϊνες ρύθμισης της πλειοδυναμίας (Hadjimichael et al. 2017) (εικόνα 54). Παράλληλα όμως μείωσε τον Zeb1 που είναι ένας EMT παράγοντας και εκφράζεται σε μεσεγχυματικά κύτταρα (P. Zhang, Sun, and Ma 2015). Μείωση παρατηρήσαμε και στον TGFβ-R2 ο οποίος σχετίζεται με την PML στην EMT διαδικασία (Hadjimichael et al. 2017). Τέλος μειώθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης βιμεντίνης, χαρακτηριστική των μεσεγχυματικών κυττάρων και της pSTAT3 η οποία σχετίζεται με την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων (Xie, Li, and Zhang 2018). Η παρατήρηση ότι ο PML ενδεχομένως μειώνει τη μεσεγχυματικότητα των WJ-MSCs, έρχεται σε αντίθεση με την προαναφερθείσα μελέτη. Όμως αυτό εξηγείται από τους διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης που διέπουν τα μεσεγχυματικά κύτταρα και την πηγή προέλευσης τους, καθώς επίσης και τους μηχανισμούς που διέπουν τα καρκινικά κύτταρα. Αντίθετα είδαμε αύξηση του PDGFRα υποδοχέα ο οποίος εκφράζεται υψηλά στους μεσοδερμικούς προγονικούς πληθυσμούς και στους περιαγγειακούς ιστούς έχοντας παρακρινικό ρόλο (Farahani and Xaymardan 2015).



Εικόνα 54 qRT-PCR ανάλυση για το PML, τους παράγοντες πλειοδυναμίας Oct4 & Nanog, τον Zeb1 μεσεγχυματικό δείκτη, TGFβR2 ρυθμιστής του μεσεγχυματικού προφίλ των κυττάρων και το PDGFRa (A). Πρωτεϊνική έκφραση για την PML πρωτεϊνη, OCT4, παράγοντες του κυτταρικού κύκλου RB, Cyclin D1, p21 και παράγοντες που σχετίζονται με τη μεσεγχυματικότητα και την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων pSTAT3 & βιμεντίνη. Πρωτεΐνη αναφοράς η ACTIN (B)

Η PML αυξάνεται στην πορεία της διαφοροποίησης των WJ-MSCs προς οστεοκύτταρα και μειώνεται όταν αυτά διαφοροποιούνται προς λιποκύτταρα.

Θέλοντας να μελετήσουμε τον πιθανό ρόλο της PML στην πορεία της διαφοροποίησης των κυττάρων προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα, παρατηρήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της PML στην πορεία της διαφοροποίησης ανάμεσα στα WJ-MSCs και στα BM-MSCs. Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι η PML αυξάνεται στην οστεο-διαφοροποίηση (εικόνα 55), ενώ μειώνεται στην λιπο-διαφοροποίηση (εικόνα 56) και στους δύο κυτταρικούς τύπους μελέτης. Αυτό υποδηλώνει πως η συμμετοχή της PML, εάν υπάρχει, στις δύο διαφοροποιήσεις πιθανά δεν γίνεται με τον ίδιο τρόπο. Πράγματι η αύξηση της έκφρασης της PML στα οστεοκύτταρα συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου η PML ανεβαίνει στην πορεία της διαφοροποίησης των μυελικών μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοκύτταρα (J. Sun et al. 2013). Η μείωση από την άλλη μεριά της PML στην λιποδιαφοροποίηση υποδηλώνει ότι ίσως εμποδίζει τη διαδικασία. Σε ποντίκια στα οποία είχε γίνει απαλοιφή του PML ήταν παχύσαρκα υποδηλώνοντας έναν ρυθμιστικό ρόλο στη λιπογένεση (Μ. Κ. Kim et al. 2011). Από την άλλη μεριά σε πιο πρόσφατη μελέτη καταδεικνύεται ο ρόλος της PML στην λιπογένεση μέσω της ρύθμισης της αυτοφαγίας και συγκεκριμένα της PKCβ επάγωντας τον PPARy. Σε δείγματα μάλιστα υπέρβαρων ασθενών εντόπισαν αυξημένα επίπεδα PML και PKCβ συγκριτικά με φυσιολογικού βάρους άτομα (Morganti et al. 2019). Όταν καλλιεργήσαμε τα WJ-MSCs σε θρεπτικό μέσο που είχαν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, διαπιστώσαμε ότι τα κύτταρα εξέφραζαν ΡΡΑRy, ο οποίος δεν μειωνόταν από την επώαση των κύτταρων με As₂O₃, που αποικοδομεί την PML πρωτεΐνη (εικόνα 56, C). Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των μελετών μαζί με τις δικές μας παρατηρήσεις χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση.

Η επαγωγή των βασικών ρυθμιστών της διαφοροποίησης RUNX2, για τα οστεοκύτταρα, και PPARγ για λιποκύτταρα ήταν πολύ χαμηλότερη στα WJ-MSCs και το συνολικό δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων χαμηλότερο (Batsali et al. 2017). Ένα από τα βασικά προβλήματα των WJ-MSCs αναφορικά με τις διαφοροποιήσεις ήταν η αυξημένη πολλαπλασιαστική τους ικανότητα. Είναι σημαντικό τα κύτταρα να μειώσουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους για να μπορέσουν να διαφοροποιηθούν.



Εικόνα 55 qRT-PCR ανάλυση για το PML και το RUNX2 στην πορεία της διαφοροποίησης των κυττάρων σε οστεοκύτταρα, ανάμεσα στα WJ-MSCs και στα BM-MSCs, καθώς επίσης και της IBSP στα BM-MSCs. n=4 (A). Χρώση με Alizarin RED στην πορεία της διαφοροποίησης των WJ-MSCs τη μέρα 14 (B).



Εικόνα 56 qRT-PCR ανάλυση για το PML και το PPARγ στην πορεία της διαφοροποίησης των κυττάρων σε λιποκύτταρα, ανάμεσα στα WJ-MSCs και στα BM-MSCs n=4 (A). Χρώση λιπιδίων με Red Oil O των λιποκυττάρων στην πορεία της διαφοροποίησης των WJ-MSCs τη μέρα 21 (B). Χρώση με ανοσοαποτύπωση των PML-NBs στον πυρήνα των WJ-MSCs (πράσινο) σε συνεστιακό μικροσκόπιο και PPARγ (πράσινο) ύστερα από καλλιέργεια των κυττάρων σε υψηλής περιεκτικότητας γλυκόζη. Western-Blot ανάλυση για τα PML & PPARγ όταν καλλιεργήθηκαν παρουσία As₂O₃ (C)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι η PML ανάλογα με το περιβάλλον των κυττάρων ρυθμίζει διαφορετικά τη βιολογία τους. Στην περίπτωση των WJ-MSCs για πρώτη φορά είδαμε την έκφραση της PML και πως μεταβάλλονται οι παράγοντες πλειοδυναμίας από την αποσιώπηση της. Παρατηρήσαμε τα μείωση παραγόντων που εκφράζονται σε μεσεγχυματικά κύτταρα, ενώ αυξήθηκε ο PDGFRα που σχετίζεται με παρακρινείς μηχανισμούς στα μεσεγχυματικά κύτταρα. Αναφορικά με τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς οστεοκύτταρα φαίνεται ότι η PML είναι απαραίτητη για τη διαδικασία. Στην περίπτωση της λιπογένεσης, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, καθώς η δράσης φαίνεται πως μεταβάλλεται ανάλογα τα κύτταρα προέλευσης και το περιβάλλον που αναπτύσσονται.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

<u>Πίνακας 6 Λίστα γονιδίων</u>		
<u>8 κοινά γονίδια με αυξημένη</u>	ημένη 20 κοινά γονίδια με μειωμένη έκφραση στα	
<u>έκφραση στα MDAMB231 & MCF7</u>	<u>MDAMB231 & MCF7</u>	
CCNA1	SLC5A12	IFITM10
CCDC85A	CTSS	NAALADL2
CENPV	SLIT2	MAOB
C9orf152	WNK4	RASD1
RNF144A	ICAM1	ITGB2-AS1
ZNF888	RELB	STC1
RRM2	TNFAIP3	C10orf11
PIM1	SPRY4	STX2
	OXTR	PML
	AARD	NRK

<u>Πίνακας 7 λίστα γονιδίων</u>

23 κοινά γονίδια μειωμένα στα MCF7 και αυξημένα στα MDAMB231			
LCN2			ID1
C15orf48			SMARCD3
ARTN			TMEM121
IFIT1			CERS4
ZDHHC1			PSTPIP2
TUBB3			C6orf52
FAM20C			PYCARD
SH3TC1			BRSK2
ENHO			FSCN1
COL6A2			H1FX-AS1
S100A2			PALM
GPRC5C			
<u>8 κοινά γονίδια αυξημένα στα MCF7 και μειωμένα στα MDAMB231</u>			
DMD	LCP1	ZNF547	
KCTD12	PCDHA13	KLF12	
PLXNA2	WASF3		

Πίνακας 9 Λίστα με τα γονίδια που εκφράζονται σε πνευμονικές μεταστάσεις από κύτταρα MDA.MB.231 διαδοχικών περασμάτων (P2-LM2) και τα οποία ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς με πρωτογενείς όγκους που εξέφραζαν η όχι τα γονίδια αυτά (Rosetta training set). Στον πίνακα παρατίθενται 16 γονίδια με p-value ≤0.05. (Minn et al, 2005)

Fold		
Change	Gene Title	Gene Symbol
407.01	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC
147.27	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	PTPRN2
97.07	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	PTPRN2
58.71	colony stimulating factor 3 (granulocyte)	CSF3
48.52	interleukin 13 receptor, alpha 2	IL13RA2
	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1 /// killer cell lectin-like	
33.05	receptor subfamily C, member 2	KLRC1 /// KLRC2
20.03	collagen, type I, alpha 1	COL1A1
15.67	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	PTPRN2
14.65	melanoma antigen, family D, 4 /// melanoma antigen, family D, 4	MAGED4
13.50	glycophorin C (Gerbich blood group)	GYPC
13.35	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1
12.82	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	KYNU
8.99	Epiregulin	EREG
7.43	tenascin C (hexabrachion)	TNC
6.77	Interferon stimulated gene 20kDa	ISG20
6.75	Aldehvde dehvdrogenase 3 family, memberA1	ALDH3A1
6.35	collagen, type VI, alpha 1	COL6A1
6.34	keratin hair basic 1	KRTHB1
6.29	kvnureninase (I-kvnurenine hvdrolase)	KYNU
0.20	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and	
6.23	cyclooxygenase)	PTGS2
5.83	Lysosomal-associated multispanning membrane protein-5	LAPTM5
5.74	chromosome 10 open reading frame 116, adipose specific 2	C100RF116
5.29	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G	APOBEC3G
5.02	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA
4.86	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)	ROBO1
	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator	
4.63	inhibitor type 1), member 2	SERPINE2
4.56	SPANX family, member C	SPANXC
4.56	angiopoietin-like 4	ANGPTL4
4.55	fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	FSCN1
4.47	jagged 1 (Alagille syndrome)	JAG1
4.45	SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4
-		SPANXB1 ///
4.40	SPANX family, member B1 /// SPANX family, member C	SPANXC
4.26	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	ARHGDIB
4.24	collagen, type VI, alpha 1	COL6A1
4.21	SPANX family, member B1	SPANXB1
4.16	Interferon stimulated gene 20kDa	ISG20
4.01	glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)	QPCT
3.99	fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	FSCN1
	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity,	ĺ
3.89	alpha)	CXCL1
	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV	
3.85	collagenase)	MMP2
3.76	doublecortin and CaM kinase-like 1	DCAMKL1
------	--	-----------
3.71	Stomatin	STOM
3.62	G protein-coupled receptor 153	GPR153
3.59	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	MAN1A1
3.57	chromosome 14 open reading frame 139	C14orf139
	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta,	
3.54	convertase)	CASP1
3.42	immunoglobulin superfamily, member 4	IGSF4
3.41	latent transforming growth factor beta binding protein 1	LTBP1
3.24	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	KYNU
3.24	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	NR2F1
3.21	epithelial membrane protein 1	EMP1
3.21	Lysosomal-associated multispanning membrane protein-5	LAPTM5
3.17	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1-like antisense	SLC22A1LS
3.15	epithelial membrane protein 1	EMP1
3.12	microfibrillar-associated protein 2	MFAP2
3.10	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID1
3.10	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	SLCO4A1
3.07	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2	CNOT2
3.07	Activating transcription factor 1	ATF1
3.06	zinc finger protein 185 (LIM domain)	ZNF185
3.02	hypothetical protein LOC221810	LOC221810
0.33	ATPase, Class VI, type 11A	ATP11A
0.33	muscleblind-like 2 (Drosophila)	MBNL2
0.33	isocitrate dehvdrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	IDH2
0.33	olfactomedin-like 2A	OLFML2A
0.32	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	NEDD9
0.32	cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 2, 150kDa	CRSP2
	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-	
0.32	macrophage)	CSF2RA
	likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene /// likely ortholog of mouse	
0.32	limb-bud and heart gene	LBH
0.31	molybdenum cofactor sulfurase	MOCOS
0.31	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	HLA-DPA1
0.30	nicotinamide N-methyltransferase	NNMT
0.30	membrane-bound transcription factor protease, site 2	MBTPS2
0.30	claudin 4	CLDN4
0.30	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1
0.30	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	EPHX1
0.30	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10
0.29	muscleblind-like 2 (Drosophila)	MBNL2
0.29	TBC1 domain family, member 4	TBC1D4
0.28	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	MYH10
0.27	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	ROR1
0.27	dishevelled associated activator of morphogenesis 1	DAAM1
0.26	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1A	HDHD1A
0.25	glutathione S-transferase M4	GSTM4
0.25	LOC388483	
0.24	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	GSN
0.24	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	MYH10
0.24	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	EDIL3
0.23	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	HLA-DPB1

0.23	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3	HLA-DRB3
0.23	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3	HLA-DRB3
0.23	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	ARNT2
0.22	nerve growth factor, beta polypeptide	NGFB
0.21	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	RARRES3
0.21	nicotinamide N-methyltransferase	NNMT
0.21	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1
0.18	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	CASK
0.18	Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	
0.17	matrilin 2	MATN2
0.16	par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. elegans) /// par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. elegans)	PARD6B
0.16	serine protease inhibitor, Kazal type 4	SPINK4
0.16	colony stimulating factor 1 (macrophage)	CSF1
0.16	complement component 4 binding protein, beta	C4BPB
0.14	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	LY6E
0.13	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	HLA-DPA1
0.12	chromosome 6 open reading frame 108	C6orf108
0.10	acetylserotonin O-methyltransferase-like	ASMTL
0.09	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	ABCC3
0.08	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4
0.07	cystatin F (leukocystatin)	CST7
0.07	KIAA1199	KIAA1199
0.06	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4
0.04	par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. elegans)	PARD6B

Gene	LogFC	pvalue	Gene	LogFC	pvalue
<fctr></fctr>	<dbl></dbl>	<dbl></dbl>	<fctr></fctr>	<dbl></dbl>	<dbl></dbl>
RAB3IL1	4.795859	0.051901	UST	-2.18899	0.165565
ZNF385B	4.741767	0.070764	TCF12	-2.19004	0.073426
NEURL1B	3.167056	0.007163	MEGF9	-2.19142	0.108959
PIR	3.04106	0.088473	STXBP5	-2.19775	0.126669
RHOB	3.025425	0.036204	TGFBR2	-2.22336	0.027724
IGFBP4	2.617768	0.007	BCL6	-2.25667	0.111994
ID1	2.466488	0.102193	SPRY4	-2.26371	0.030783
MTSS1L	2.372364	0.030579	MERTK	-2.27543	0.043404
ZNF618	2.371241	0.037096	CPEB2	-2.31249	0.085304
CELF4	2.370723	0.10458	ARID3B	-2.32406	0.107875
FSCN1	2.221392	0.027547	DCP2	-2.33622	0.030488
HMGB2	1.74683	0.095588	MGLL	-2.4018	0.014874
TMEM200B	1.650769	0.106429	FZD1	-2.64149	0.085313
LMNB1	1.183965	0.98929	HDAC9	-2.73663	0.007664
TBC1D9	-1.16876	0.74977	STC1	-2.74848	0.008042
KCTD10	-1.70394	0.143742	NHEJ1	-2.76658	0.067347
LHFPL2	-1.744	0.35971	SRPX2	-2.77449	0.101951
KIF13A	-1.75784	0.123133	TRIB1	-2.88436	0.030292
PALM2-AKAP2	-1.80867	0.063454	PLXNA2	-2.88629	0.044327
TSC1	-1.9246	0.08288	MARCH1	-3.4487	0.199658
FRMD4A	-1.95069	0.070837	ACOXL	-3.45073	0.152783
EMP1	-2.00566	0.034638	TNC	-3.47505	0.019099
BACH1	-2.02124	0.118979	TNFSF15	-3.8421	0.000705
EFNB2	-2.04662	0.104651	SGIP1	-4.64386	0.084977
WNT5B	-2.06461	0.102494	CLIC5	-5.34341	0.06808
ATXN1	-2.16183	0.077974	NRK	-5.45269	0.072735
STAC	-2.18443	0.102512	VCAN	-6.35632	0.000857

<u>Πίνακας : Λίστα 55 γονιδίων στόχων της TWIST1 πρωτεΐνης που είναι διαφορικώς</u> εκφραζόμενα στα MDAMB231 KD PML σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

Gene	LogFC	pvalue	Gene	LogFC	pvalue
<fctr></fctr>	<dbl></dbl>	<dbl></dbl>	<fctr></fctr>	<dbl></dbl>	<dbl></dbl>
PALM2-	-1.80867	0.063454	PLXNA2	-2.88629	0.044327
STC1	-2.74848	0.008042	IGFBP4	2.617768	0.007
VCAN	-6.35632	0.000857	MERTK	-2.27543	0.043404
TNC	-3.47505	0.019099	EMP1	-2.00566	0.034638
RHOB	3.025425	0.036204	HDAC9	-2.73663	0.007664
MTSS1L	2.372364	0.030579	SPRY4	-2.26371	0.030783
RAB3IL1	4.795859	0.051901	DCP2	-2.33622	0.030488
TGFBR2	-2.22336	0.027724	TNFSF15	-3.8421	0.000705
NEURL1B	3.167056	0.007163	ZNF618	2.371241	0.037096
MGLL	-2.4018	0.014874	FSCN1	2.221392	0.027547
TRIB1	-2.88436	0.030292			

Πίνακας : Λίστα 21 γονιδίων στόχων της Ρ53 πρωτεΐνης που είναι διαφορικώς εκφραζόμενα στα MDAMB231 KD PML σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

Σετ εκκινητών που χ	ρησιμοποιήθηκαν γ	<u>για τις gRT-PCR mRNA ανάλυση:</u>	

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

van 't Veer, Laura J et al. 2002. "Gene Expression Profiling Predicts Clinical Outcome of Breast Cancer." <i>Nature</i> 415(6871): 530–36.
Aboulkheyr Es, Hamidreza et al. 2020. "Mesenchymal Stem Cells Induce PD-L1 Expression through the Secretion of CCL5 in Breast Cancer Cells." <i>Journal of Cellular Physiology</i> .
Al-Hajj, Muhammad et al. 2003. "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(7): 3983–88.
Almendro, V, and G Fuster. 2011. "Heterogeneity of Breast Cancer: Etiology and Clinical Relevance." Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico 13(11): 767–73.
Amaro, Adriana et al. 2016. "A Highly Invasive Subpopulation of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Shows Accelerated Growth, Differential Chemoresistance, Features of Apocrine Tumors and Reduced Tumorigenicity in Vivo." <i>Oncotarget</i> 7(42): 68803–20.
Augello, Andrea, Tobias B Kurth, and Cosimo De Bari. 2010. "Mesenchymal Stem Cells: A Perspective from in Vitro Cultures to in Vivo Migration and Niches." <i>European cells & materials</i> 20: 121–33.
Ayuzawa, Rie et al. 2009. "Naïve Human Umbilical Cord Matrix Derived Stem Cells Significantly Attenuate Growth of Human Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo." <i>Cancer letters</i> 280(1): 31–37.
Banani, Salman F et al. 2016. "Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies." Cell 166(3): 651–63.
Batsali, Aristea K et al. 2017. "Differential Expression of Cell Cycle and WNT Pathway-Related Genes Accounts for Differences in the Growth and Differentiation Potential of Wharton's Jelly and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." <i>Stem cell research & therapy</i> 8(1): 102.
Batsali, Aristea K, Maria-Christina Kastrinaki, Helen A Papadaki, and Charalampos Pontikoglou. 2013. "Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord: Biological Properties and Emerging Clinical Applications." <i>Current stem cell research & therapy</i> 8(2): 144–55.
Beck, Benjamin, and Cédric Blanpain. 2013. "Unravelling Cancer Stem Cell Potential." <i>Nature reviews. Cancer</i> 13(10): 727–38.
Bernardi, Rosa et al. 2004. "PML Regulates P53 Stability by Sequestering Mdm2 to the Nucleolus." <i>Nature cell biology</i> 6(7): 665–72.
———, 2006. "PMI Inhibits HIF-1alpha Translation and Neoangiogenesis through Repression of MTOR." Nature

442(7104): 779–85.

Bernardi, Rosa, and Pier Paolo Pandolfi. 2007. "Structure, Dynamics and Functions of Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies." Nature reviews. Molecular cell biology 8(12): 1006–16.

Bhat-Nakshatri, Poornima et al. 2010. "SLUG/SNAI2 and Tumor Necrosis Factor Generate Breast Cells with CD44+/CD24- Phenotype." *BMC cancer* 10: 411.

Bieback, Karen, and Irena Brinkmann. 2010. "Mesenchymal Stromal Cells from Human Perinatal Tissues: From Biology to Cell Therapy." World journal of stem cells 2(4): 81–92.

Bildsoe, Heidi et al. 2016. "Transcriptional Targets of TWIST1 in the Cranial Mesoderm Regulate Cell-Matrix Interactions and Mesenchyme Maintenance." *Developmental biology* 418(1): 189–203.

Bill, Ruben, and Gerhard Christofori. 2015. "The Relevance of EMT in Breast Cancer Metastasis: Correlation or Causality?" *FEBS letters* 589(14): 1577–87.

Blandino, Giovanni, and Silvia Di Agostino. 2018. "New Therapeutic Strategies to Treat Human Cancers Expressing Mutant P53 Proteins." Journal of Experimental and Clinical Cancer Research 37(1): 1–13.

Borden, Katherine L B. 2002. "Pondering the Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Puzzle: Possible Functions for PML Nuclear Bodies." *Molecular and cellular biology* 22(15): 5259–69.

— — . 2008. "Pondering the Puzzle of PML (Promyelocytic Leukemia) Nuclear Bodies: Can We Fit the Pieces Together Using an RNA Regulon?" *Biochimica et biophysica acta* 1783(11): 2145–54.

Borgna, Silvia et al. 2012. "Mesenchymal Traits Are Selected along with Stem Features in Breast Cancer Cells Grown as Mammospheres." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11(22): 4242–51.

Brand, Peter, Thorsten Lenser, and Peter Hemmerich. 2010. "Assembly Dynamics of PML Nuclear Bodies in Living Cells." *PMC Biophysics* 3(1): 3. https://doi.org/10.1186/1757-5036-3-3.

Carracedo, Arkaitz et al. 2012. "A Metabolic Prosurvival Role for PML in Breast Cancer." *The Journal of clinical investigation* 122(9): 3088–3100.

Celià-Terrassa, Toni. 2018. "Mammary Stem Cells and Breast Cancer Stem Cells: Molecular Connections and Clinical Implications." *Biomedicines* 6(2).

Chaffer, Christine L et al. 2013. "Poised Chromatin at the ZEB1 Promoter Enables Breast Cancer Cell Plasticity and Enhances Tumorigenicity." *Cell* 154(1): 61–74.

Chelbi-Alix, M K et al. 1995. "Induction of the PML Protein by Interferons in Normal and APL Cells." *Leukemia* 9(12): 2027–33.

- Chen, Wenjing, Andrew D Hoffmann, Huiping Liu, and Xia Liu. 2018. "Organotropism: New Insights into Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis." NPJ precision oncology 2(1): 4.
- Cooks, Tomer et al. 2018. "Mutant P53 Cancers Reprogram Macrophages to Tumor Supporting Macrophages via Exosomal MiR-1246." *Nature communications* 9(1): 771.

- Van Damme, Ellen, Kris Laukens, Thanh Hai Dang, and Xaveer Van Ostade. 2010. "A Manually Curated Network of the PML Nuclear Body Interactome Reveals an Important Role for PML-NBs in SUMOylation Dynamics." International journal of biological sciences 6(1): 51–67.
- Dellaire, Graham et al. 2006. "Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies Behave as DNA Damage Sensors Whose Response to DNA Double-Strand Breaks Is Regulated by NBS1 and the Kinases ATM, Chk2, and ATR." *The Journal of cell biology* 175(1): 55–66.
- DEOME, K B, L J Jr FAULKIN, H A BERN, and P B BLAIR. 1959. "Development of Mammary Tumors from Hyperplastic Alveolar Nodules Transplanted into Gland-Free Mammary Fat Pads of Female C3H Mice." *Cancer research* 19(5): 515–20.
- Dephoure, Noah et al. 2008. "A Quantitative Atlas of Mitotic Phosphorylation." *Proceedings of the National* Academy of Sciences of the United States of America 105(31): 10762–67.
- Drakos, Elias et al. 2007. "C-Jun Expression and Activation Are Restricted to CD30+ Lymphoproliferative Disorders." *The American journal of surgical pathology* 31(3): 447–53.
- Du, Bowen, and Joong Sup Shim. 2016. "Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer." *Molecules* 21(7).
- Everett, Roger D et al. 2006. "PML Contributes to a Cellular Mechanism of Repression of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection That Is Inactivated by ICPO." *Journal of virology* 80(16): 7995–8005.
- Fanelli, Mirco et al. 2004. "The Coiled-Coil Domain Is the Structural Determinant for Mammalian Homologues of Drosophila Sina-Mediated Degradation of Promyelocytic Leukemia Protein and Other Tripartite Motif Proteins by the Proteasome." *The Journal of biological chemistry* 279(7): 5374–79.
- Farahani, Ramin M, and Munira Xaymardan. 2015. "Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha as a Marker of Mesenchymal Stem Cells in Development and Stem Cell Biology." Stem cells international 2015: 362753.
- Ferbeyre, G et al. 2000. "PML Is Induced by Oncogenic Ras and Promotes Premature Senescence." Genes & development 14(16): 2015–27.
- Ferrari, M et al. 2007. "Adult Stem Cells: Perspectives for Therapeutic Applications." Veterinary research communications 31 Suppl 1: 1–8.
- Fillmore, Christine M, and Charlotte Kuperwasser. 2008. "Human Breast Cancer Cell Lines Contain Stem-like Cells That Self-Renew, Give Rise to Phenotypically Diverse Progeny and Survive Chemotherapy." *Breast cancer research : BCR* 10(2): R25.
- Fong, C Y et al. 2007. "Comparative Growth Behaviour and Characterization of Stem Cells from Human Wharton's Jelly." *Reproductive biomedicine online* 15(6): 708–18.
- Fong, Chui-Yee et al. 2011. "Human Wharton's Jelly Stem Cells Have Unique Transcriptome Profiles Compared to Human Embryonic Stem Cells and Other Mesenchymal Stem Cells." *Stem cell reviews and reports* 7(1): 1– 16.
- Forrester, Elizabeth et al. 2005. "Effect of Conditional Knockout of the Type II TGF-Beta Receptor Gene in Mammary Epithelia on Mammary Gland Development and Polyomavirus Middle T Antigen Induced Tumor Formation and Metastasis." Cancer research 65(6): 2296–2302.
- Fu, Nai Yang, Emma Nolan, Geoffrey J. Lindeman, and Jane E. Visvader. 2020. "Stem Cells and the Differentiation Hierarchy in Mammary Gland Development." *Physiological Reviews* 100(2): 489–523. https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00040.2018 (January 25, 2021).
- Gang, Eun Ji et al. 2004. "Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood." Stem cells (Dayton, Ohio) 22(4): 617–24.
- Gao, Lian Ru et al. 2013. "Common Expression of Stemness Molecular Markers and Early Cardiac Transcription Factors in Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells and Embryonic Stem Cells." *Cell transplantation* 22(10): 1883–1900.
- Geoffroy, Marie-Claude, Ellis G Jaffray, Katherine J Walker, and Ronald T Hay. 2010. "Arsenic-Induced SUMO-Dependent Recruitment of RNF4 into PML Nuclear Bodies." *Molecular biology of the cell* 21(23): 4227–39.
- Gialitakis, Manolis, Panagiota Arampatzi, Takis Makatounakis, and Joseph Papamatheakis. 2010. "Gamma Interferon-Dependent Transcriptional Memory via Relocalization of a Gene Locus to PML Nuclear Bodies." *Molecular and cellular biology* 30(8): 2046–56. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20123968.
- Gresko, E et al. 2009. "PML Tumor Suppressor Is Regulated by HIPK2-Mediated Phosphorylation in Response to DNA Damage." *Oncogene* 28(5): 698–708. https://doi.org/10.1038/onc.2008.420.
- Guo, A et al. 2000. "The Function of PML in P53-Dependent Apoptosis." *Nature cell biology* 2(10): 730–36.
- Guo, Yongli et al. 2010. "Blockade of the Ubiquitin Protease UBP43 Destabilizes Transcription Factor PML/RARα and Inhibits the Growth of Acute Promyelocytic Leukemia." *Cancer research* 70(23): 9875–85.
- Gupta, Gaorav P et al. 2007. "ID Genes Mediate Tumor Reinitiation during Breast Cancer Lung Metastasis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(49): 19506–11.
- Gupta, Piyush B et al. 2011. "Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells." *Cell* 146(4): 633–44.
- Gurrieri, Carmela et al. 2004. "Loss of the Tumor Suppressor PML in Human Cancers of Multiple Histologic Origins." Journal of the National Cancer Institute 96(4): 269–79.
- Hadjimichael, Christiana et al. 2017. "Promyelocytic Leukemia Protein Is an Essential Regulator of Stem Cell Pluripotency and Somatic Cell Reprogramming." *Stem cell reports* 8(5): 1366–78.

- Hands, Katherine J, Delphine Cuchet-Lourenco, Roger D Everett, and Ronald T Hay. 2014. "PML Isoforms in Response to Arsenic: High-Resolution Analysis of PML Body Structure and Degradation." *Journal of Cell Science* 127(2): 365 LP – 375. http://jcs.biologists.org/content/127/2/365.abstract.
- Hilfiker, Andres, Cornelia Kasper, Ralf Hass, and Axel Haverich. 2011. "Mesenchymal Stem Cells and Progenitor Cells in Connective Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Is There a Future for Transplantation?" Langenbeck's archives of surgery 396(4): 489–97.
- Hofmann, Thomas G et al. 2002. "Regulation of P53 Activity by Its Interaction with Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2." *Nature cell biology* 4(1): 1–10.
- Hoischen, Christian, Shamci Monajembashi, Klaus Weisshart, and Peter Hemmerich. 2018. "Multimodal Light Microscopy Approaches to Reveal Structural and Functional Properties of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies." Frontiers in oncology 8: 125.
- Hoshino, Ayuko et al. 2015. "Tumour Exosome Integrins Determine Organotropic Metastasis." *Nature* 527(7578): 329–35.
- Hsu, K-S et al. 2016. "Translational Control of PML Contributes to TNFα-Induced Apoptosis of MCF7 Breast Cancer Cells and Decreased Angiogenesis in HUVECs." *Cell death and differentiation* 23(3): 469–83.
- Hsu, Kuo-Sheng et al. 2017. "Dual Regulation of Stat1 and Stat3 by the Tumor Suppressor Protein PML Contributes to Interferon α-Mediated Inhibition of Angiogenesis." The Journal of biological chemistry 292(24): 10048–60.
- Hsu, Kuo-Sheng, and Hung-Ying Kao. 2018. "PML: Regulation and Multifaceted Function beyond Tumor Suppression." Cell & bioscience 8: 5.
- Idowu, Michael O et al. 2012. "CD44(+)/CD24(-/Low) Cancer Stem/Progenitor Cells Are More Abundant in Triple-Negative Invasive Breast Carcinoma Phenotype and Are Associated with Poor Outcome." Human pathology 43(3): 364–73.
- Ito, Keisuke et al. 2008. "PML Targeting Eradicates Quiescent Leukaemia-Initiating Cells." Nature 453(7198): 1072–78.
- — —. 2012. "A PML–PPAR-δ Pathway for Fatty Acid Oxidation Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance." Nature medicine 18(9): 1350–58.
- Ivanschitz, Lisa et al. 2015. "PML IV/ARF Interaction Enhances P53 SUMO-1 Conjugation, Activation, and Senescence." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112(46): 14278–83.
- Jacob, Leni S et al. 2015. "Metastatic Competence Can Emerge with Selection of Preexisting Oncogenic Alleles without a Need of New Mutations." *Cancer research* 75(18): 3713–19.
- Jia, Yunlu et al. 2017. "Exosome: Emerging Biomarker in Breast Cancer." Oncotarget 8(25): 41717-33.
- Jiang, Yi-Zhou et al. 2019. "Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies." *Cancer cell* 35(3): 428-440.e5.
- Jones, Susan. 2004. "An Overview of the Basic Helix-Loop-Helix Proteins." Genome biology 5(6): 226.
- Kakizuka, A et al. 1991. "Chromosomal Translocation t(15;17) in Human Acute Promyelocytic Leukemia Fuses RAR Alpha with a Novel Putative Transcription Factor, PML." *Cell* 66(4): 663–74.
- Kamitani, T et al. 1998. "Identification of Three Major Sentrinization Sites in PML." *The Journal of biological chemistry* 273(41): 26675–82.
- Kang, Yibin et al. 2003. "A Multigenic Program Mediating Breast Cancer Metastasis to Bone." *Cancer cell* 3(6): 537–49.
- Karahuseyinoglu, Sercin et al. 2007. "Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and in Vitro Surveys." Stem cells (Dayton, Ohio) 25(2): 319–31.
- Karimian, Ansar, Yasin Ahmadi, and Bahman Yousefi. 2016. "Multiple Functions of P21 in Cell Cycle, Apoptosis and Transcriptional Regulation after DNA Damage." DNA repair 42: 63–71.
- Karnoub, Antoine E et al. 2007. "Mesenchymal Stem Cells within Tumour Stroma Promote Breast Cancer Metastasis." *Nature* 449(7162): 557–63. https://doi.org/10.1038/nature06188.
- Kato, Masaya et al. 2015. "PML Suppresses IL-6-Induced STAT3 Activation by Interfering with STAT3 and HDAC3 Interaction." *Biochemical and biophysical research communications* 461(2): 366–71.
- Khan, M M et al. 2001. "Role of PML and PML-RARalpha in Mad-Mediated Transcriptional Repression." *Molecular cell* 7(6): 1233–43.
- Khoury, Marie P, and Jean-Christophe Bourdon. 2010. "The Isoforms of the P53 Protein." Cold Spring Harbor perspectives in biology 2(3): a000927.
- Kim, Michael P, and Guillermina Lozano. 2018. "Mutant P53 Partners in Crime." *Cell death and differentiation* 25(1): 161–68.
- Kim, Myung K et al. 2011. "Promyelocytic Leukemia Inhibits Adipogenesis, and Loss of Promyelocytic Leukemia Results in Fat Accumulation in Mice." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism 301(6): E1130–42.
- Kumar, Pavan P et al. 2007. "Functional Interaction between PML and SATB1 Regulates Chromatin-Loop Architecture and Transcription of the MHC Class I Locus." *Nature cell biology* 9(1): 45–56.
- Lallemand-Breitenbach, Valérie, and Hugues de Thé. 2010. "PML Nuclear Bodies." Cold Spring Harbor perspectives in biology 2(5): a000661.

Langley, Emma et al. 2002. "Human SIR2 Deacetylates P53 and Antagonizes PML/P53-Induced Cellular Senescence." *The EMBO journal* 21(10): 2383–96.

- Li, Weiqing et al. 2018. "Identification of Genes Associated with Matrix Metalloproteinases in Invasive Lung Adenocarcinoma." Oncology letters 16(1): 123–30.
- Li, Wenjing et al. 2009. "PML Depletion Disrupts Normal Mammary Gland Development and Skews the Composition of the Mammary Luminal Cell Progenitor Pool." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(12): 4725–30.
- Liu, Allan Yi et al. 2014. "Twist2 Promotes Self-Renewal of Liver Cancer Stem-like Cells by Regulating CD24." *Carcinogenesis* 35(3): 537–45.
- Lloyd-Lewis, Bethan, Olivia B. Harris, Christine J. Watson, and Felicity M. Davis. 2017. "Mammary Stem Cells: Premise, Properties, and Perspectives." *Trends in Cell Biology* 27(8): 556–67. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28487183/ (January 25, 2021).
- Louria-Hayon, I et al. 2009. "E6AP Promotes the Degradation of the PML Tumor Suppressor." *Cell death and differentiation* 16(8): 1156–66.
- Machesky, Laura M, and Ang Li. 2010. "Fascin: Invasive Filopodia Promoting Metastasis." *Communicative & integrative biology* 3(3): 263–70.

Macias, Hector, and Lindsay Hinck. 2012. "Mammary Gland Development." Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology 1(4): 533–57.

Mantovani, Fiamma, Dawid Walerych, and Giannino Del Sal. 2017. "Targeting Mutant P53 in Cancer: A Long Road to Precision Therapy." *FEBS Journal* 284(6): 837–50.

Martín-Martín, Natalia et al. 2016. "Stratification and Therapeutic Potential of PML in Metastatic Breast Cancer." Nature communications 7: 12595.

- Martin-Martin, Natalia, James D Sutherland, and Arkaitz Carracedo. 2013. "PML: Not All about Tumor Suppression." *Frontiers in oncology* 3: 200.
- Martín-Pardillos, Ana et al. 2019. "The Role of Clonal Communication and Heterogeneity in Breast Cancer." BMC Cancer 19(1): 666. https://doi.org/10.1186/s12885-019-5883-y.

Martincorena, Iñigo, and Peter J Campbell. 2015. "Somatic Mutation in Cancer and Normal Cells." Science (New York, N.Y.) 349(6255): 1483–89.

- Meyer, Matthew J et al. 2009. "Dynamic Regulation of CD24 and the Invasive, CD44posCD24neg Phenotype in Breast Cancer Cell Lines." *Breast cancer research : BCR* 11(6): R82.
- Minn, Andy J et al. 2005. "Genes That Mediate Breast Cancer Metastasis to Lung." Nature 436(7050): 518–24.

Missiroli, Sonia et al. 2016. "PML at Mitochondria-Associated Membranes Is Critical for the Repression of Autophagy and Cancer Development." *Cell reports* 16(9): 2415–27.

Morganti, Claudia et al. 2019. "Regulation of PKCβ Levels and Autophagy by PML Is Essential for High-Glucose-Dependent Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis." *International journal of obesity (2005)* 43(5): 963–73.

Nagamura-Inoue, Tokiko, and Haiping He. 2014. "Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells: Their Advantages and Potential Clinical Utility." *World journal of stem cells* 6(2): 195–202.

- Nekanti, Usha et al. 2010. "Long-Term Expansion and Pluripotent Marker Array Analysis of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Stem cells and development* 19(1): 117–30.
- Oraiopoulou, M-E et al. 2018. "Integrating in Vitro Experiments with in Silico Approaches for Glioblastoma Invasion: The Role of Cell-to-Cell Adhesion Heterogeneity." *Scientific reports* 8(1): 16200.
- Pawlus, M R, L Wang, and C-J Hu. 2014. "STAT3 and HIF1α Cooperatively Activate HIF1 Target Genes in MDA-MB-231 and RCC4 Cells." Oncogene 33(13): 1670–79.
- Perdikogianni, C et al. 2008. "Could Cord Blood Be a Source of Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Use?" *Cytotherapy* 10(5): 452–59.
- Phillips, Sarah, and Charlotte Kuperwasser. 2014. "SLUG: Critical Regulator of Epithelial Cell Identity in Breast Development and Cancer." *Cell adhesion & migration* 8(6): 578–87.
- Poloni, Antonella et al. 2011. "Human Mesenchymal Stem Cells from Chorionic Villi and Amniotic Fluid Are Not Susceptible to Transformation after Extensive in Vitro Expansion." *Cell transplantation* 20(5): 643–54.
- Ponente, Manfredi et al. 2017. "PML Promotes Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer through Transcriptional Regulation of HIF1A Target Genes." JCI insight 2(4): e87380.
- Powell, Emily, David Piwnica-Worms, and Helen Piwnica-Worms. 2014. "Contribution of P53 to Metastasis." *Cancer discovery* 4(4): 405–14.
- Prasad, Anil et al. 2008. "Slit-2 Induces a Tumor-Suppressive Effect by Regulating Beta-Catenin in Breast Cancer Cells." *The Journal of biological chemistry* 283(39): 26624–33.
- Prat, Aleix, and Charles M Perou. 2011. "Deconstructing the Molecular Portraits of Breast Cancer." *Molecular* oncology 5(1): 5–23.
- Rachakatla, R S et al. 2007. "Development of Human Umbilical Cord Matrix Stem Cell-Based Gene Therapy for Experimental Lung Tumors." *Cancer gene therapy* 14(10): 828–35.
- Rastogi, Namrata, and Durga Prasad Mishra. 2012. "Therapeutic Targeting of Cancer Cell Cycle Using Proteasome Inhibitors." *Cell division* 7(1): 26.
- Regad, Tarik, Cristian Bellodi, Pierluigi Nicotera, and Paolo Salomoni. 2009. "The Tumor Suppressor Pml Regulates Cell Fate in the Developing Neocortex." *Nature neuroscience* 12(2): 132–40.

Reimand, Jüri et al. 2016. "G:Profiler-a Web Server for Functional Interpretation of Gene Lists (2016 Update)." Nucleic acids research 44(W1): W83-9.

- Reineke, Erin L et al. 2008. "Degradation of the Tumor Suppressor PML by Pin1 Contributes to the Cancer Phenotype of Breast Cancer MDA-MB-231 Cells." *Molecular and cellular biology* 28(3): 997–1006.
- Reineke, Erin L, Yu Liu, and Hung-Ying Kao. 2010. "Promyelocytic Leukemia Protein Controls Cell Migration in Response to Hydrogen Peroxide and Insulin-like Growth Factor-1." *The Journal of biological chemistry* 285(13): 9485–92.
- Sachini, Nikoleta et al. 2019. "Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Controls Breast Cancer Cell Proliferation by Modulating Forkhead Transcription Factors." *Molecular oncology* 13(6): 1369–87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30927552 (May 5, 2020).
- Saeg, Fouad, and Muralidharan Anbalagan. 2018. "Breast Cancer Stem Cells and the Challenges of Eradication: A Review of Novel Therapies." *Stem cell investigation* 5: 39.
- Salsman, Jayme et al. 2017. "PML Nuclear Bodies Contribute to the Basal Expression of the MTOR Inhibitor DDIT4." *Scientific reports* 7: 45038.
- Scaglioni, Pier Paolo et al. 2012. "Translation-Dependent Mechanisms Lead to PML Upregulation and Mediate Oncogenic K-RAS-Induced Cellular Senescence." *EMBO molecular medicine* 4(7): 594–602.
- Schrijver, Willemijne A M E, Paul J van Diest, and Cathy B Moelans. 2017. "Unravelling Site-Specific Breast Cancer Metastasis: A MicroRNA Expression Profiling Study." Oncotarget 8(2): 3111–23.
- Shah, Sumit J et al. 2008. "UBE1L Represses PML/RAR{alpha} by Targeting the PML Domain for ISG15ylation." Molecular cancer therapeutics 7(4): 905–14.
- Shen, Tian Huai et al. 2006. "The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation." Molecular cell 24(3): 331–39.
- Sheridan, Carol et al. 2006. "CD44+/CD24- Breast Cancer Cells Exhibit Enhanced Invasive Properties: An Early Step Necessary for Metastasis." *Breast cancer research : BCR* 8(5): R59.
- Shtutman, Michael et al. 2002. "PML Is a Target Gene of Beta-Catenin and Plakoglobin, and Coactivates Beta-Catenin-Mediated Transcription." *Cancer research* 62(20): 5947–54.
- Sondka, Zbyslaw et al. 2018. "The COSMIC Cancer Gene Census: Describing Genetic Dysfunction across All Human Cancers." *Nature reviews. Cancer* 18(11): 696–705.
- Song, Min Sup et al. 2008. "The Deubiquitinylation and Localization of PTEN Are Regulated by a HAUSP-PML Network." *Nature* 455(7214): 813–17.
- Stadler, M et al. 1995. "Transcriptional Induction of the PML Growth Suppressor Gene by Interferons Is Mediated through an ISRE and a GAS Element." *Oncogene* 11(12): 2565–73.
- de Stanchina, Elisa et al. 2004. "PML Is a Direct P53 Target That Modulates P53 Effector Functions." *Molecular cell* 13(4): 523–35.
- Stankic, Marko et al. 2013. "TGF-β-Id1 Signaling Opposes Twist1 and Promotes Metastatic Colonization via a Mesenchymal-to-Epithelial Transition." *Cell reports* 5(5): 1228–42.
- Sun, Bo et al. 2010. "Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Matrix Prohibits Metastatic Cancer Cell MDA-MB-231 Proliferation." *Cancer letters* 296(2): 178–85.
- Sun, Jie, Shan Fu, Weijun Zhong, and He Huang. 2013. "PML Overexpression Inhibits Proliferation and Promotes the Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells." *Oncology reports* 30(6): 2785–94.
- Sun, Yujie, Linda K Durrin, and Theodore G Krontiris. 2003. "Specific Interaction of PML Bodies with the TP53 Locus in Jurkat Interphase Nuclei." *Genomics* 82(2): 250–52.
- Tang, Qiaosi, Zhenyi Su, Wei Gu, and Anil K Rustgi. 2020. "Mutant P53 on the Path to Metastasis." *Trends in cancer* 6(1): 62–73.
- Thakur, Ravi et al. 2015. "Inhibition of STAT3, FAK and Src Mediated Signaling Reduces Cancer Stem Cell Load, Tumorigenic Potential and Metastasis in Breast Cancer." *Scientific reports* 5: 10194.
- de Thé, H et al. 1991. "The PML-RAR Alpha Fusion MRNA Generated by the t(15;17) Translocation in Acute Promyelocytic Leukemia Encodes a Functionally Altered RAR." *Cell* 66(4): 675–84.
- de Thé, Hugues, and Zhu Chen. 2010. "Acute Promyelocytic Leukaemia: Novel Insights into the Mechanisms of Cure." *Nature reviews. Cancer* 10(11): 775–83.
- Trotman, Lloyd C et al. 2006. "Identification of a Tumour Suppressor Network Opposing Nuclear Akt Function." *Nature* 441(7092): 523–27.
- Tsai, Jeff H et al. 2012. "Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis." *Cancer cell* 22(6): 725–36.
- Tuan, Rocky S, Genevieve Boland, and Richard Tuli. 2003. "Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell-Based Tissue Engineering." Arthritis research & therapy 5(1): 32–45.
- Uversky, Vladimir N. 2017. "Intrinsically Disordered Proteins in Overcrowded Milieu: Membrane-Less Organelles, Phase Separation, and Intrinsic Disorder." *Current opinion in structural biology* 44: 18–30.
- Vesuna, Farhad, Ala Lisok, Brian Kimble, and Venu Raman. 2009. "Twist Modulates Breast Cancer Stem Cells by Transcriptional Regulation of CD24 Expression." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11(12): 1318–28.

Visvader, Jane E. 2011. "Cells of Origin in Cancer." Nature 469(7330): 314-22.

Wang, Xiao-Yan et al. 2008. "Identification of Mesenchymal Stem Cells in Aorta-Gonad-Mesonephros and Yolk Sac of Human Embryos." *Blood* 111(4): 2436–43.

Weisshaar, Stefan R et al. 2008. "Arsenic Trioxide Stimulates SUMO-2/3 Modification Leading to RNF4-Dependent

Proteolytic Targeting of PML." FEBS letters 582(21-22): 3174-78.

- Wexler, Sarah A et al. 2003. "Adult Bone Marrow Is a Rich Source of Human Mesenchymal 'stem' Cells but Umbilical Cord and Mobilized Adult Blood Are Not." *British journal of haematology* 121(2): 368–74.
- Xie, Yi, Jianmin Li, and Chao Zhang. 2018. "STAT3 Promotes the Proliferation and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells by Regulating AKT2." *Oncology letters* 15(3): 3333–38.
- Xu, Liangliang et al. 2017. "Tissue Source Determines the Differentiation Potentials of Mesenchymal Stem Cells: A Comparative Study of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue." Stem cell research & therapy 8(1): 275.
- Yamada, Nami et al. 2014. "Colorectal Cancer Cell-Derived Microvesicles Containing MicroRNA-1246 Promote Angiogenesis by Activating Smad 1/5/8 Signaling Elicited by PML down-Regulation in Endothelial Cells." Biochimica et biophysica acta 1839(11): 1256–72.
- Yang, Shutong, Christin Kuo, John E Bisi, and Myung K Kim. 2002. "PML-Dependent Apoptosis after DNA Damage Is Regulated by the Checkpoint Kinase HCds1/Chk2." *Nature cell biology* 4(11): 865–70.
- Yiin, Jia-Jean et al. 2009. "Slit2 Inhibits Glioma Cell Invasion in the Brain by Suppression of Cdc42 Activity." *Neurooncology* 11(6): 779–89.
- Yousefi, Meysam et al. 2018. "Organ-Specific Metastasis of Breast Cancer: Molecular and Cellular Mechanisms Underlying Lung Metastasis." *Cellular oncology (Dordrecht)* 41(2): 123–40.
- Yu, Bo, Xiaomin Zhang, and Xiaorong Li. 2014. "Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells." International Journal of Molecular Sciences 15(3).
- Yu, Min et al. 2013. "Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition." *Science (New York, N.Y.)* 339(6119): 580–84.
- Yuan, Wei-Chien et al. 2011. "A Cullin3-KLHL20 Ubiquitin Ligase-Dependent Pathway Targets PML to Potentiate HIF-1 Signaling and Prostate Cancer Progression." *Cancer cell* 20(2): 214–28.
- Zhang, Peijing, Yutong Sun, and Li Ma. 2015. "ZEB1: At the Crossroads of Epithelial-Mesenchymal Transition, Metastasis and Therapy Resistance." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 14(4): 481–87.
- Zhang, Xiao-Wei et al. 2010. "Arsenic Trioxide Controls the Fate of the PML-RARalpha Oncoprotein by Directly Binding PML." *Science (New York, N.Y.)* 328(5975): 240–43.
- Zhang, Xiaoli, Kimerly Powell, and Lang Li. 2020. "Breast Cancer Stem Cells: Biomarkers, Identification and Isolation Methods, Regulating Mechanisms, Cellular Origin, and Beyond." *Cancers* 12(12).
- Zhong, S, P Salomoni, and P P Pandolfi. 2000. "The Transcriptional Role of PML and the Nuclear Body." *Nature cell biology* 2(5): E85-90.
- Zhou, Jiaojiao et al. 2019. "Stem Cells and Cellular Origins of Breast Cancer: Updates in the Rationale, Controversies, and Therapeutic Implications." *Frontiers in oncology* 9: 820.